

DER TRANSLATIONSAPPARAT VON ARCHAEBAKTERIEN:
ANTIBIOTIKA-WIRKUNG UND ALARMON-SYNTHESE

Dieter Elhardt

Duss München
1983



Der Translationsapparat von Archaeobakterien:

Antibiotika-Wirkung und Alarmon-Synthese

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dieter Elhardt
aus
Kempten / Allgäu

April 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1983

ABKÜRZUNGEN

A	Absorption
Ci	Curie
CCCP	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IF-3	Translations-Initiationsfaktor 3
m.o.i.	Multiplizität der Infektion
mRNA	"messenger"-Ribonukleinsäure
PheRS	Phenylalanyl-tRNA-Synthetase
poly(U)	poly(Uridylsäure)
poly(UG)	poly(Uridylsäure-Guanylsäure)
ppGpp	Guanosin-3'-Diphosphat-5'-Diphosphat
pppGpp	Guanosin-3'-Triphosphat-5'-Diphosphat
psi	"pounds"/inch ²
r-	ribosomal
TCA	Trichloressigsäure
ThrRS	Threonyl-tRNA-Synthetase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ts	temperatursensitiv

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A) EINLEITUNG	1
B) MATERIAL UND METHODEN	7
I) Bakterienstämme, Medien und Anzuchtbedingungen	7
II) Versuche zur <u>in vivo</u> Regulation	11
a) Experiment zur Wachstumsraten-abhängigen Regulation an <u>E. coli</u>	11
b) Experiment zur <u>in vivo</u> Stringent Kontrolle an <u>E. coli</u>	12
c) Analyse der Synthese von ppGpp an <u>Halo-bacterium halobium in vivo</u> unter Energiemangel	13
d) Analyse möglicher ppGpp-Synthese von <u>Halo-bacterium halobium</u> unter Aminosäuremangel	14
e) Effekt von Pseudomonadinsäure auf Wachstum und Aktivität der Isoleucyl-tRNA-Synthetase von <u>Methanococcus vanniellii</u>	15
III) Zusammensetzung der <u>in vitro</u> Translationssysteme	15
a) Das λ p2-DNA-kodierte <u>in vitro</u> Proteinsynthesesystem	15
b) Das <u>in vitro</u> Polyphenylalaninsynthese-System von <u>Methanococcus vanniellii</u>	18
c) Bestimmung des fehlerhaften Einbaus von Aminosäuren in Polypeptide	20
d) Das <u>in vitro</u> Polyphenylalaninsynthese-System von <u>Methanobacterium formicicum</u>	20
IV) Versuche zur ppGpp-Synthese <u>in vitro</u>	21
V) Konzentrationsbestimmungen	22

C) ERGEBNISSE	24
I) Regulation der Bildung von Phenylalanin-tRNA-Synthetase, Threonyl-tRNA-Synthetase und Translations-Initiationsfaktor 3 aus <u>E. coli</u>	24
a) <u>In vivo</u> Untersuchungen	24
1. Regulation in Abhängigkeit von der Wachstumsrate	24
2. Gen-Dosis-Abhängigkeit der Synthese	26
3. Synthese von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, Threonyl-tRNA-Synthetase und Initiationsfaktor 3 unter Aminosäuremangelbedingungen	29
b) <u>In vitro</u> Translation	31
1. Identifizierung der Genprodukte	31
2. Zeitabhängigkeit der <u>in vitro</u> -Bildung der λ p2-Genprodukte	33
3. Beeinflusst IF-3 seine eigene Synthese autoregulatorisch?	35
c) Einfluß von ppGpp auf die <u>in vitro</u> Expression der Strukturgene von Initiationsfaktor 3, Threonyl-tRNA-Synthetase und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase	35
II) Untersuchungen zum Vorkommen von ppGpp in Archaeobakterien	39
a) Versuch zum Nachweis von ppGpp in <u>Halobacterium halobium</u> unter Aminosäuremangel- bzw. Energiemangelbedingungen	39
b) Experimente zur <u>in vitro</u> Synthese von ppGpp an Ribosomen von methanogenen Bakterien	44
c) Versuch zur heterologen ppGpp-Synthese an Ribosomen methanogener Bakterien, katalysiert durch 0.5 M NH_4Cl Waschfraktion von <u>E. coli</u> -Ribosomen	50
III) Analyse der Sensitivität von Ribosomen methanogener Bakterien gegenüber Antibiotika	54
a) Aufstellung eines <u>in vitro</u> Polypeptidsynthesesystems aus <u>Methanococcus vannielii</u>	54
b) Der Einfluß von Proteinsynthesehemmern an 70S Ribosomen auf die <u>in vitro</u> Translation methanogener Bakterien	61

c) Untersuchung des Einflusses von 80S Protein-synthese-Inhibitoren auf die poly(U)-abhängige Translation methanogener Bakterien	64
d) Bestimmung des Fehleinbaus von Aminosäuren in das poly(U)-abhängige Polypeptidsynthese-System aus <u>Methanococcus vanniellii</u>	66
D) DISKUSSION	69
E) ZUSAMMENFASSUNG	82
F) LITERATURVERZEICHNIS	84

A) EINLEITUNG

In der exponentiellen Wachstumsphase ist die Bildung der verschiedenen Zellbausteine einer Bakterienzelle aufs Beste miteinander abgestimmt (1). Während Zellen höherer Organismen mit ihrem zirka 500-fach größeren Volumen vielfältig kompartimentiert sind, läuft im bakteriellen Cytoplasma ein Nebeneinander zahlreicher unterschiedlicher Prozesse ab. Dies macht die Notwendigkeit einer strikten Koordination offensichtlich.

Besonderes Interesse kommt in dieser Hinsicht der Regulation der Synthese des Translationsapparates zu, da er bis zu 60 % der Gesamtmasse einer Bakterienzelle ausmachen kann; unter dieser Bedingung verbraucht seine Synthese etwa 70 % des zellulär umgesetzten ATP. Dementsprechend haben sich vielfältige Kontrollmechanismen entwickelt, die Syntheseraten und damit den zellulären Anteil des Proteinsyntheseapparates den physiologischen Bedingungen anpassen. Maaløe (1) fordert sogar, daß die Fähigkeit der Bakterien, ihre Wachstumsrate zu regulieren, auf der Kapazität zur Kontrolle der Bildung des Proteinsyntheseapparates beruht.

Zwei Grundmuster kennzeichnen diese Regulationsmechanismen: Interne genetische Kontrolle und äußere chemische Umgebung. So sind die Strukturgene bakterieller ribosomaler Proteine nicht nur aneinander angrenzend organisiert beziehungsweise liegen in Nachbarschaft zu denen der Proteinsynthese-Elongationsfaktoren (2) und der Untereinheiten der RNA-Polymerase (3), sondern sie werden auch gemeinsam mit diesen transkribiert; Gene für ribosomale RNA bilden zusammen mit tRNA-Genen Transkriptionsein-



heiten (4). Auf eine strenge genetische Kontrolle läßt auch die exakte Stöchiometrie schließen, die im Verhältnis zwischen rRNA und ribosomalen Proteinen in der Zelle gefunden wird; obwohl E. coli sieben Transkriptionseinheiten für rRNA, dagegen nur jeweils ein Strukturgen für r-Proteine pro Zelle besitzt, trifft man keine Ribosomenbestandteile im Cytoplasma an, die nicht assembliert vorliegen (5, 6). Eines der wichtigsten Ziele der genetischen Kontrolle scheint demnach zu sein, die Synthese der stöchiometrisch richtigen Menge der einzelnen Komponenten des Translationsapparates zu gewährleisten.

Eine zweite Art von Regulationssignalen geht von der chemischen Umwelt aus und verleiht den Bakterien die Fähigkeit, die Synthese des Translationsapparates den Wachstumsbedingungen anzupassen. Zwei Phänomene werden dabei unterschieden:

- (i) Metabolische Kontrolle und
- (ii) Stringent Kontrolle.

"Metabolische Kontrolle" wurde bei der Untersuchung der Regulation der Ribosomensynthese entdeckt (7) und später für andere Komponenten des Translationsapparates nachgewiesen (8). Sie besagt, daß der zelluläre Anteil der regulierten Komponente parallel zur Wachstumsrate ansteigt; das heißt, bei einer Verdoppelung der Wachstumsgeschwindigkeit kommt es zu einem (über Vervierfachung der Syntheserate bewirkten) um 100 % erhöhten zellulären Spiegel.

"Stringent Kontrolle" dagegen setzt ein, wenn eine Bakterienkultur einer raschen Änderung der Verfügbarkeit von Aminosäuren oder der Energiequelle ausgesetzt wird. Entzieht man "stringent" regulierten Zellen eine zum Wachstum benötigte Aminosäure, so findet in kurzer Zeit eine Anpassung verschiedenster Stoffwechselaktivitäten an die neue Situation statt (9). Schon innerhalb von Sekunden erfolgt eine drastische Hemmung beziehungsweise

Stimulation der Syntheserate zahlreicher Zellbestandteile. O'Farrell hat in einer umfangreichen Analyse quantifiziert, daß unter Aminosäurenentzugsbedingungen 25 % aller Zellproteine von E. coli in ihrer Synthese stimuliert und 25 % stark gehemmt werden; der Rest bleibt unbeeinflusst (10).

Was sind nun die biochemischen Effektoren, die in "Metabolischer Regulation" und in der "Stringent Kontrolle" Genexpression beeinflussen? Zahlreiche, durch in vivo und in vitro Experimente erhaltene Hinweise deuten darauf hin, daß dem unüblichen Guanosinnukleotid Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat (ppGpp) diese Rolle zukommt. Die wichtigsten davon sind:

- (i) Die intrazelluläre Konzentration von ppGpp variiert mit der Wachstumsrate, und zwar umgekehrt proportional (11).
- (ii) Bei Aminosäurenmangel oder Energiemangel werden hohe Konzentrationen von ppGpp angehäuft (12).
- (iii) Mutanten (rel⁻), die nicht mehr zur "Stringent Kontrolle" befähigt sind, häufen bei Aminosäuremangel kein ppGpp an. Die entsprechenden Mutationen kartieren in einem Gen (rel), dessen Produkt für die enzymatische Synthese von ppGpp verantwortlich ist (13).
- (iv) Für einige Gene, deren Expression in vivo "stringent" oder "metabolisch" reguliert wird, konnte auch in vitro ein entsprechender Einfluß von ppGpp aufgezeigt werden (14, 15, 16). Wirkungsort war dabei in allen Fällen die Transkription. So wurde beobachtet, daß ppGpp die Transkription der Strukturgene für rRNA beziehungsweise r-Proteine hemmt (17, 18), die einer Aminoacyl-tRNA Synthetase und der Aminosäuren-biosynthetischen Enzyme jedoch stimuliert (19, 20).

Das übergreifende Regulationssignal in der Synthese des Translationsapparates (und anderer zellulärer Komponenten) scheint

damit ppGpp zu sein. Eine Feinkontrolle ist jedoch noch zusätzlich damit gekoppelt, nämlich die autogene Regulation, vor allem ribosomaler Proteine. r-Proteine vermögen ihre eigene Biosynthese auf der Ebene der Translation zu reprimieren (21, 22). Wird durch Veränderung der Wachstumsbedingung eine Reduktion der Rate der Ribosomenbildung verursacht, so verhindert dieser Autoregulationsmechanismus die Anhäufung freier, nicht in Organellen eingebauter ribosomaler Proteine.

So war nun das erste Ziel dieser Arbeit, weitere in vitro-Hinweise dafür zu erbringen, daß ppGpp für die in vivo beobachteten Regulationsphänomene der tatsächliche Effektor ist. Weiterhin sollte studiert werden, ob alle Komponenten des Translationsapparates einer autogenen Kontrolle unterliegen. Da in unserem Labor Klone der Gene für zwei Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ThrRS und PheRS) und für den Initiationsfaktor 3 (IF-3) zur Verfügung standen (23, 24), und da in vitro Informationen über die Regulation dieser Komponenten des Proteinsyntheseapparates bisher nicht oder nur in beschränktem Umfang vorlagen, wurden die Untersuchungen auf die Expression der Gene für PheRS, ThrRS und IF-3 konzentriert.

Es ist nun interessant, daß der "sekundäre Messenger" ppGpp in allen untersuchten Eubakterien synthetisiert wird (9), daß trotz intensiver Suche sein Vorkommen in Eukaryontenzellen (außer in Mitochondrien oder Chloroplasten) nicht nachgewiesen werden konnte (25). ppGpp scheint damit ein auf Prokaryonten beschränktes Effektormolekül zu sein. Die Fähigkeit zur Synthese von ppGpp stellt damit möglicherweise eine der Eigenschaften dar, in denen sich eubakterielle und eukaryontische (80S) Proteinsynthese unterscheiden.

Ein neuer Ansatz war es nun, diese Analyse auf Organismen des Archaeobakterienreiches auszudehnen. Breites Interesse kommt diesen Besiedlern extremer Standorte (wie z.B. Salzlake, sauerstofffreien Gewässersedimenten oder vulkanischen Quellen) zu, seit

Untersuchungen der Chemie ihrer zellulären Makromoleküle drastische Unterschiede im Vergleich mit typischen Bakterienvertretern an den Tag brachten. So enthält die Zellwand dieser Organismen kein Murein (26), und die Membranlipide sind durch Äther- anstelle von Esterbindungen zusammengehalten (27, 28). Auch die Quartärstruktur der DNA-abhängigen RNA-Polymerase weicht von dem für Bakterien typischen Muster ab (29, 30). Doch war es der Vergleich der im Verlauf der Evolution sehr konservativ erhaltenen 16S-RNA-Basensequenz, der diese Organismengruppe aus dem "Reich" der Prokaryonten herausrücken ließ (31).

Solche strukturellen Charakteristika stellen vielleicht Anpassungen an extreme Habitate dar, doch ist der Gedanke nicht von der Hand zu weisen, die anaeroben methanogenen Bakterien könnten ein Relikt aus einer erdgeschichtlichen Zeit sein, in der es noch keine klassischen "Eu"bakterien und keine höheren, eukaryontischen Organismen gab. Ihm verdankt diese heutige Bakteriengruppe den Namen "Archaeobakterien" (32).

Aufgrund der bekannten Unterschiede des 70S und 80S Ribosoms von Eubakterien und Eukaryonten kommt der Analyse des Archaeobakterienribosoms ein besonderes Interesse zu, und zwar sowohl in Hinblick auf die phylogenetische Sonderstellung dieser Organismen als auch auf die Entwicklung des Ribosoms per se. Folgende Fakten sind über das Archaeobakterien-Ribosom bisher bekannt:

Die Ribosomen von Archaeobakterien sedimentieren als 70S-Partikel, die in 30S- und 50S-Untereinheiten dissoziieren können. Eine Reihe anderer Charakteristika weicht von dem Bild eines typisch eubakteriellen Ribosoms ab: So zeigten Untersuchungen der physikalischen Organisation der rRNA Gene von Methanococcus vannielii durch Jarsch et al. (33), daß zwar eine ("eubakterielle") Anordnung 16S - 23S - 5S gegeben ist. Andererseits existiert aber eine 5S rDNA Sequenz, die wie bei Eukaryonten räumlich getrennt von den anderen rRNA Genen liegt.

Manche Archaeobakterien haben eine aufwendigere Proteinausstattung (34, 35), was an die Komplexität eukaryontischer Ribosomen erinnert. Auch die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors II durch Diphtherie-Toxin, wie sie für Halobakterien zum ersten Mal gezeigt wurde (36), war zuvor nur bei eukaryontischen Zellen beschrieben (37, 38). Schließlich erwies sich der archaeobakterielle Proteinsyntheseapparat in einem vierten Punkt verschieden von dem typischer Bakterien: Kulturen von methanogenen Bakterien sowie von Halobakterien wurden selbst durch hohe Dosen von verschiedenen 70S-Proteinsynthesehemmstoffen im Medium nicht im Wachstum gehemmt. Andererseits blieben auch klassische Inhibitoren des 80S-Ribosoms ohne Wirkung auf diese Organismen (39, 40, 41).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde nun einmal untersucht, ob Archaeobakterien unter Bedingungen der "Stringent Kontrolle" den sekundären Messenger ppGpp anhäufen können. Es wurde gefunden, daß dies nicht der Fall ist. Ein in vitro System wurde entwickelt, um die biochemischen Ursachen dieser Defizienz zu analysieren.

Dieses entwickelte in vitro System konnte dann dazu herangezogen werden, die Sensitivität von Archaeobakterien-Ribosomen gegenüber Proteinsynthesehemmern zu untersuchen. Die Wirkung von Antibiotika auf die Archaeobakterien-Proteinsynthese wurde bisher nur in vivo studiert; die hier erhaltenen in vitro-Ergebnisse liefern den ersten direkten Hinweis, daß Archaeobakterien-Ribosomen ein für Prokaryonten unübliches Sensitivitätsspektrum aufweisen.

B) MATERIAL UND METHODEN

I) Bakterienstämme, Medien und Anzuchtbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Als Standardmedium zur Kultur von E. coli diente TYGE-Medium:

Trypton	1 %
Hefeextrakt	0.5 %
Glucose	0.2 %

Für die Bereitung von S30-Extrakten für das in vitro-System wurde Stamm KL19 bei 34°C in einem Medium folgender Zusammensetzung gezogen (g/l):

KH_2PO_4	5.6
K_2HPO_4	29.0
Hefeextrakt	10.0
Vitamin B1	0.015
Glucose	10.0
(nach Zubay et al. (46))	

Zur Vermehrung von λ -Phagen wurden die Wirtszellen (Stamm RW262) in Top-Agar inkubiert (Trypton 1 %; Agar 0.8 %), der auf TB-Platten ausgegossen war (Trypton 1 %; Maltose 0.2 %; MgSO_4 10 mM; Agar 1.5 %).

Für Isotopenmarkierungsversuche kam ein synthetisches, auf

Tabelle 1: Verwendete Stämme von Mikroorganismen

Stämme	Genotyp	Herkunft
<u>E. coli Stämme:</u>		
NC3	prototroph	F. C. Neidhardt, Ann Arbor
KL19	Hfr, prototroph, λ^+	B. Bachmann, Yale University
RW262	<u>supF⁺</u> <u>tonA</u>	Schrenk and Weisberg (42)
NF314	<u>leu</u> <u>relA⁺</u>	Blumenthal et al. (43)
NF536	<u>leu</u> <u>valS^{ts}</u> <u>relA⁺</u>	Blumenthal et al. (43)
NF537	<u>leu</u> <u>valS^{ts}</u> <u>relA1</u>	Blumenthal et al. (43)
RR1	<u>leu</u> <u>pro</u> <u>B₁⁻</u> <u>r_K⁻</u> <u>m_K⁻</u> <u>lacY</u> <u>strA</u>	E. M. Lederberg, Stanford
RR1/pHWO	wie RR1; enthält pBR322 mit <u>EcoRI</u> / <u>HindIII</u> Restriktionsfragment von λ p2	R. Wirth; Plumbridge et al. (24)
AB1361	<u>F⁻</u> <u>thi-1</u> <u>argE3</u> <u>his-4</u> <u>proA2</u> <u>lacY1</u> <u>galK2</u> <u>pheS18</u> <u>mtl-1</u> <u>xyl-5</u> <u>tsx-29</u> <u>supE44</u> λ^-	Hennecke et al. (23)
AB1361-8	λ p2-lysogener Stamm von AB1361	Hennecke et al. (23)
E.coli B	prototroph	
CP79	<u>thi-1</u> <u>thr-1</u> <u>leu-6</u> <u>his-65</u> <u>arg-46</u> <u>gal-3</u> <u>xyl-7</u> <u>malA1</u> <u>mtl-2</u> <u>ara13</u> <u>tonA2?</u> <u>supE44</u> <u>rel-2</u> λ^R	Fiil and Friesen (44)
<u>Archaeobakterien:</u>		
	Methanococcus vanniellii	DSM Nr. 1224
	Methanobacterium formicicum	DSM Nr. 1213
	Methanobacterium thermoautotrophicum	DSM Nr. 1053
	Halbacterium halobium	DSM Nr. 760
<u>Andere Mikroorganismen:</u>		
	Saccharomyces cerevisiae Y166	A. Jiménez, Madrid; Stöcklein and Piepersberg (45)

4-Morpholinpropansulfonsäure basierendes Minimalmedium (MOPS-Medium) zur Verwendung, wie es von Neidhardt et al. beschrieben ist (47, 48).

Für Hefekulturen wurde YDP-Medium verwendet:

Hefeextrakt	0.5 %
Pepton	1 %
Glucose	2 %

Die Wachstumstemperatur betrug 28°C.

Halobakterien wurden auf einem Medium folgender Zusammensetzung angezogen (g/l):

Bakteriologisches Pepton	10
NaCl	250
KCl	2
Natrium-Citrat	3
pH	6.8

Nach dem Autoklavieren wurde L-Arginin zu einer Endkonzentration von 0.1 % steril zugegeben.

Flüssig-Kulturen von E. coli, Hefe und Halobakterien wurden in Erlenmeyerkolben in New Brunswick Wasserbadschüttlern bei guter Belüftung bebrütet (37°C, wenn nicht anders angegeben). Das Wachstum wurde durch Messung der Zunahme der Absorption bei 420 nm oder 578 nm (A_{420} bzw. A_{578}) verfolgt. Am Ende der logarithmischen Phase des Wachstums wurden die Kolben in Eiswasser gekühlt und die Zellen durch Zentrifugation gesammelt (7 000 Umdrehungen/Minute, 15 min, 4°C). Sie wurden in 1/10 Volumen Puffer A (Tris-Chlorid pH 7.4, 20 mM; $MgCl_2$ 10 mM; NH_4Cl 30 mM; DTT 2 mM) gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet.

Methanobacterium thermoautotrophicum wurde bei 65°C in DSM-Medium Nr. 131 unter einer Gasatmosphäre von 80 % H₂/20 % CO₂ gezogen (DSM-Katalog 1977 (49)).

Für die Anzucht von Methanococcus vanniellii und Methanobacterium formicicum wurde McM-Medium mit der folgenden Zusammensetzung verwendet (g/l):

K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.4
NaCl	0.4
NH ₄ Cl	0.4
CaCl ₂ · H ₂ O	0.05
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.002
Hefeextrakt	1.0
Casitone	2.0
Natriumformiat	1.0
Natriumacetat	1.0
NaHCO ₃	4.0
Cystein	0.5
Na ₂ S	0.5
NiCl	0.012
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	2 µM
Resazurin	0.001

Das Medium enthielt zusätzlich 6 ml/l der Spurenelementlösung SL-6 (49) und 10 ml/l einer Vitaminlösung (50). Der pH des Mediums wurde vor der Zugabe von NaHCO₃, Cystein und Na₂S mit KOH auf 6.8 eingestellt. Bebrütet wurde unter einer Atmosphäre von 80 % H₂/20 % CO₂ bei 38°C.

Alle Medien für die Anzucht methanogener Bakterien enthielten zusätzlich Ampicillin zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml. Zur Reinheitskontrolle wurden Proben aus der wachsenden Kultur einerseits im Fluoreszenzmikroskop überprüft, beziehungsweise andererseits in AC-Vollmedium (Difco) beimpft. Die Bebrütung fand unter

einer Atmosphäre von 95 % N₂/5 % H₂ statt. Die methanogenen Bakterien wurden in Serumflaschen mit 20 ml Flüssigmedium gehalten und alle drei bis fünf Tage überimpft.

Für präparative Zwecke wurden 10 l-Batch-Anzuchten in einem Fermenter (Biostat M, Braun-Melsungen) durchgeführt. Wenn notwendig, wurden die Zellen methanogener Bakterien unter Ausschluß von Sauerstoff geerntet. Die Kulturbrühe wurde dazu in einer Handschuhbox (COY Instruments) unter einer Atmosphäre von 95 % N₂/5 % H₂ in gasdichte Zentrifugenbecher gefüllt, sedimentiert (5 000 Upm/10 min) und unter gleichen Bedingungen resuspendiert.

II) Versuche zur in vivo Regulation

a) Experiment zur Wachstumsraten-abhängigen Regulation an E. coli

E. coli NC3 wurde in 5 ml-Parallelkulturen fünf bis sechs Generationen lang in MOPS Minimalmedium in Gegenwart von 40 µCi/ml L-(³H)Leucin wachsen gelassen. Die Verwendung von 0.4 % Natriumacetat, 0.4 % Glycerin, 0.4 % Glucose beziehungsweise 0.4 % Glucose plus Aminosäuren, N-Basen und Vitaminen als Kohlenstoffquellen ergab Wachstumsraten von 0.31, 0.72, 0.90 und 1.66 x h⁻¹. Alle Kulturen enthielten zusätzlich 40 µM (Endkonzentration) L-Leucin, 30 µM L-Valin und 20 µM L-Isoleucin. Eine 20 ml-Referenzkultur wurde mit 0.4 % Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen und in Gegenwart von 0.027 mM ³⁵SO₄²⁻ radioaktiv markiert. Die Bakterienzellen von allen Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase (d.h. nach Erreichen einer A₄₂₀ von 1.0) geerntet und mit Puffer B (10 mM Tris-Chlorid pH 7.4; 5 mM MgCl₂) gewaschen (0°C). Die Zellen der Referenzkultur wurden dann in vier gleiche Teile aufgeteilt und mit den Zellen je einer der (³H)-Kulturen vermischt. Nach abermaligem Waschen wurden die Zellen in 0.1 ml des gleichen Puffers resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung lysiert (6 Pulse á 3 sek mit der Mikrospritze eines Branson B15-Gerätes in Stellung 3). Die Lysate wurden weiterbehandelt wie von O'Farrell beschrieben (51).

Zur Auftrennung der Zellproteine wurde das zweidimensionale Gelsystem nach O'Farrell angewandt, das in der ersten Dimension isoelektrische Fokussierung, in der zweiten Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat vorsieht. IF-3 und die ribosomalen Proteine wurden dabei im Non-Equilibrium-System separiert: es enthält Ampholine im pH-Bereich 3,5 bis 10. Für die Auftrennung aller anderen Proteine wurde das Standard-Equilibrium-System mit Ampholine im pH-Bereich 5 bis 7 gewählt.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in den Gelen gemäß der Vorschrift von O'Farrell (52) angefärbt, anschließend getrocknet und drei bis sieben Tage lang auf Kodax XOMat AR 50-Röntgenfilmen exponiert. Anhand der Autoradiogramme wurden die entsprechenden radioaktiv markierten Proteine aus dem Gel ausgestanzt. Die Gelstücke wurden in 0.1 ml Wasser gequollen und dann drei Tage lang mit je 5 ml einer 10 : 1-Mischung von Lipoluma/Lumasolve behandelt. Die Radioaktivität wurde in einem Kontron Flüssigkeitsszintillationszähler MR 300 bestimmt.

b) Experiment zur in vivo Stringent Kontrolle an E. coli

Die Stämme NF314, NF536 und NF537, deren tatsächlicher rel-Charakter in einem Vorversuch überprüft worden war, wurden in MOPS Minimalmedium, supplementiert mit 0.4 % Glucose und 40 µg/ml L-Leucin, angezogen. Die Grundmarkierung erfolgte während des Wachstums bei permissiver Temperatur (29.5°C) für vier Generationen in Gegenwart von 1 µCi L-(¹⁴C)Lysin/ml (342 Ci/mM). Anschließend wurden die Kulturen in ein auf 35.5°C temperiertes Wasserbad transferiert und 15 min lang weitergeschüttelt, bevor ihnen 20 µCi L-(³H)Lysin/ml (93 Ci/mM) zugesetzt wurde. Nach 5 min wurde die Markierung durch Zugabe von unmarkiertem L-Lysin zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml unterbrochen. Nach Bebrüten für weitere 5 min wurden die Kulturen in Eiswasser

gekühlt und sofort mit einem gleichen Volumen einer 10 mM Natriumazid-Lösung versetzt.

Wie unter a) eingehender beschrieben, wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, in Puffer B zweimal gewaschen und anschließend durch Behandlung mit Ultraschall aufgebrochen. Zur Auftrennung der Proteine wurde der zelluläre Rohextrakt der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach O'Farrell unterworfen. Nach Anfärben der Proteine und nachfolgender Autoradiographie wurden die einzelnen Proteinflecken aus den Gelen ausgestanzt. Unter Verwendung einer 10 : 1-Lösung von Lipoluma/Lumasolve als Szintillator wurde die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

c) *Analyse der Synthese von ppGpp an Halobacterium halobium in vivo unter Energiemangel*

Halobacterium halobium wurde in Flüssigmedium ohne Zusatz von Arginin bei 40°C aerob angezogen. Der Stamm erreichte unter diesen Bedingungen eine Wachstumsgeschwindigkeit $\mu = 0.11 \text{ h}^{-1}$.

Zur Markierung der Nukleotide wurden 5 ml-Kulturen mit 100 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{32}P -Orthophosphat supplementiert und inkubiert. Zu den exponentiell wachsenden Kulturen wurde CCCP (Stammlösung von 1 mM in Halobakterienmedium) in einer Endkonzentration von 20 μM gegeben.

Unmittelbar vor Zugabe des Wirkstoffes sowie nach 2.5, 5, 10 und 20 min wurde je 1 ml der Kultur entnommen und 1 min lang in Eppendorfkegeln zentrifugiert (3 000 x g). Der Niederschlag wurde in 50 μl 1 M Ameisensäure suspendiert (0°C) und nochmals zentrifugiert. Jeweils 5 μl des Überstandes wurden auf Polyethylenimin-beschichteten Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen.

Die Platten wurden entweder eindimensional mit 1.5 M KH_2PO_4 pH 3.4 oder in einem zweidimensionalen Trennsystem entwickelt (1. Dimension: 3.3 M Ammoniumformiat und 4.2 % Borsäure, pH 7 mit

Ammoniaklösung eingestellt; 2. Dimension: 1.5 M KH_2PO_4 , pH 3.4 (53, 54)). Nach dem Lauf wurden die Platten getrocknet und über Nacht auf Kodak XOMat AR 50-Röntgenfilmen exponiert. Die gebildeten Produkte wurden identifiziert durch Vergleichen ihres Laufverhaltens im zweidimensionalen Trennsystem mit dem von authentischen Nukleotiden. Zur Bestimmung der Radioaktivität in den Nukleotiden wurden die entsprechenden Bereiche in den Dünnschichtplatten mit einem Spatel ausgekratzt. Mit je 5 ml Aqualuma Plus als Szintillator wurde die Radioaktivität einer jeden Probe im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

d) Analyse möglicher ppGpp-Synthese von Halobacterium halobium unter Aminosäuremangel

Zu exponentiell wachsenden 20 ml-Kulturen von Halobacterium halobium wurde Pseudomonadinsäure in Endkonzentrationen von 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$ gegeben. Das Wachstum wurde durch Messung der A_{420} ermittelt.

In einer zweiten Versuchsserie wurden zu 20 ml-Kulturen von H. halobium, die 1 $\mu\text{g/ml}$ Pseudomonadinsäure im Medium enthielten, L-Isoleucin zu Endkonzentrationen von 12.5, 25, 50, 100, 200 und 400 $\mu\text{g/ml}$ gegeben.

Zum Nachweis von ppGpp-Bildung wurden 5 ml-Kulturen von H. halobium mit 100 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{32}P -Orthophosphat im Medium inkubiert. Die in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Kulturen wurden mit Pseudomonadinsäure in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ versetzt. Unmittelbar vor Zugabe der Substanz sowie 2.5, 5, 10 und 20 min danach wurden 1 ml-Proben entnommen. Die weitere Behandlung, einschließlich dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Nukleotide, Autoradiographie und Bestimmung der Radioaktivität, erfolgte genau wie unter c) beschrieben.

e) *Effekt von Pseudomonadinsäure auf Wachstum und Aktivität der Isoleucyl-tRNA-Synthetase von Methanococcus vanniellii*

20 ml-Kulturen von Methanococcus vanniellii wurden mit Pseudomonadinsäure in Endkonzentrationen von 0.25, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 und 5.0 µg/ml versetzt und bei 38°C inkubiert. Es wurde festgehalten, bis zu welcher A_{420} die Kulturen innerhalb 48 h heranwuchsen.

Zur Überprüfung der Spezifität der Pseudomonadinsäure-Wirkung wurden zu einem 20 ml-Kulturen von Methanococcus vanniellii mit 1 µg/ml Pseudomonadinsäure im Medium mit 0.1, 0.25, 0.5 und 1.0 mg/ml L-Isoleucin versetzt. Die nach 48-stündiger Inkubation erreichte A_{420} wurde ebenfalls bestimmt.

Zum anderen wurde die Aktivität zellulärer Rohextrakte von Methanococcus vanniellii zur Aminoacylierung von tRNA mit (^{14}C) Isoleucin in Ansätzen folgender Zusammensetzung gemessen: Tris-Chlorid pH 7.5, 100 mM; Magnesiumacetat 10 mM; Kaliumchlorid 10 mM, Mercaptoäthanol 5 mM; tRNA 160 µg/ml; (^{14}C) Isoleucin (10 µCi/µM) 0.025 µM; S30-Extrakt 720 µg Protein/ml. Die Endkonzentrationen an Pseudomonadinsäure in den Ansätzen betrug 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5 und 10 µg/ml. Inkubiert wurde 10 min lang bei 37°C oder im Falle von Extraktion von Methanobacterium thermoautotrophicum bei 55°C. Die Radioaktivität in mit kalter TCA fällbarem Material wurde bestimmt.

III) Zusammensetzung der in vitro Translationssysteme

a) *Das $\lambda p2$ -DNA-kodierte in vitro Proteinsynthesesystem*

Für das $\lambda p2$ -DNA abhängige, gekoppelte Transkriptions-/Translationssystem wurde S30-Extrakt aus Zellen von E. coli KL19 nach

der von Zubay beschriebenen Methode gewonnen (55). Die einzigen Modifikationen waren folgende:

- (i) Die Bakterienzellen wurden durch Passieren durch eine French Press Zelle bei 2 600 psi und 4°C aufgebrochen.
- (ii) Die Dialyse zum Abschluß der Präparation wurde nur 4 x 1 h lang durchgeführt. Anschließend wurde der S30-Extrakt in kleinen Mengen portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Zur Präparation von DNA aus λ p2 wurde dieser Bakteriophage in E. coli RW262 nach dem Plattenlysisverfahren vermehrt. λ p2-Partikel und Zellen einer Kultur von RW262 in 10 mM MgSO_4 wurden mit einer m.o.i. von 0.2 in Top-Agar auf frische LB-Platten ausgegossen, so daß nach 5- bis 7-stündiger Bebrütung bei 37°C konfluente Lyse erfolgte. Aus dem Top-Agar von 150 bis 200 Platten wurden λ p2-Partikel durch differentielle Zentrifugation in Cäsiumchlorid-Stufengradienten isoliert und weiter gereinigt durch Gleichgewichtszentrifugation in Cäsiumchloridlösung. Aus den Phagen wurde durch dreimalige Phenolbehandlung und anschließender Äthanol-fällung (-20°C) DNA präpariert.

Die Translationsansätze hatten ein Volumen von 50 μ l und wurden in neuen Plastikreaktionskegeln (Eppendorf) pipettiert. Sie waren aus den folgenden Bestandteilen zusammengesetzt (angegeben in der Reihenfolge der Zugabe der Komponenten zum Reaktionsmix):

40 mM Tris-Acetat pH 8.2; 55 mM Kaliumacetat; 1.4 mM DTT; 27 mM Ammoniumacetat; 15 mM Magnesiumacetat; je 0.25 mM 19 Aminosäuren (außer Methionin); 0.025 mM L-Methionin; 50 μ g/ml E. coli tRNA; je 0.6 mM Folsäure, FAD, NADP, Pyridoxinchlorid; 2.2 mM ATP; 11 μ g/ml p-Aminobenzoessäure; je 0.6 mM CTP, UTP, GTP; 21 mM Phosphoenolpyruvat, Trinatriumsalz; 7 mM Calciumchlorid; 16 μ g/ml Polyäthylenglykol 6000; 5 μ Ci (^{35}S)Methionin (900 Ci/mM); 100 μ g/ml λ p2 DNA; S30-Extrakt, 6.000 μ g Protein/ml.

Der Reaktionsmix enthielt außer der DNA, der ^{35}S -Aminosäure und dem S30-Extrakt alle aufgeführten Substanzen. Er wurde fünf-fach konzentriert eingesetzt und für jeden Test frisch hergestellt.

Die Inkubation bei 37°C dauerte 40 min. Sie wurde beendet, indem die Reaktionsgefäße in Eiswasser gestellt und anschließend 30 sek lang am Whirlmix heftig geschüttelt wurden.

Zur Bestimmung der Gesamtsynthese wurden jeweils 5 μl aus den Proben entnommen und in 1 ml Rinderserumalbuminlösung pipettiert. Nach Mischen wurden 2 ml 10%ige TCA-Lösung zugegeben und 10 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde 20 min lang bei 100°C inkubiert, 10 min lang bei 0°C abgekühlt und der Niederschlag über Glasfaserfilter abgenutscht. Die Filter wurden zweimal mit je 10 ml kalter TCA-Lösung und einmal mit 5 ml 70%igem Äthanol gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität dieser Proben wurde in 5 ml 0.5%iger Diphenyloxazol/Toluol-Lösung in einem Kontron MR 300 Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Der übrige Teil des in vitro Reaktionsgemisches wurde zur Auftrennung der gebildeten Proteine mit Puffer A auf ein Volumen von 200 μl , mit DNase I (Reinheitsgrad 2) und RNase A auf eine Endkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ gebracht und 10 min lang bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden mit 2 Volumina kalten Acetons (p.A., -20°C) ausgefällt. Nach einstündiger Aufbewahrung in Eiswasser wurde das Präzipitat gesammelt (3 000 x g/5 min) und im Exsikkator getrocknet. Es wurde in Lysis-Puffer nach O'Farrell (51) gelöst und über zweidimensionale Nonequilibrium- oder Equilibrium-Gelelektrophorese nach O'Farrell aufgetrennt (52). Entsprechend ihrer durch Autoradiographie festgestellten Wanderungsposition wurden die in vitro gebildeten Proteine aus den Gelen ausgestanzt und in 0.1 ml Wasser gequollen. Mit je 5 ml einer 10:1-Lösung von Lipoluma/Lumasolve als Szintillator wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

b) Das in vitro Polyphenylalaninsynthese-System von Methanococcus vanniellii

Zur Gewinnung von Extrakten und Ribosomen methanogener Bakterien für die in vitro Translation wurden French Press Zelle und Zentrifugenbecher mit Schutzgas (95 % N_2 /5 % H_2) beschickt. Zellen von Methanococcus vanniellii wurden durch Passieren durch eine French Press Zelle bei 3 000 psi (4°C) aufgebrochen. Den Extrakten wurde DNase beigeetzt (Reinheitsgrad II; Endkonzentration 1 µg/ml) und Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (30 000 x g/2 x 20 min/4°C). Aus dem in diesem Schritt gewonnenen S30-Extrakt wurden durch hochtourige Zentrifugation (100 000 x g/2 h) 70S-Ribosomen sedimentiert. Die oberen drei Viertel des Überstandes wurden als S100 Extrakt bezeichnet; sie wurden in Portionen schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Um Kontakt mit Luftsauerstoff zu vermeiden, wurden die S100 Extrakte von der Präparation an bis zum Einsatz im Testsystem unter Schutzgas (95 % N_2 /5 % H_2) gehandhabt.

Zur weiteren Reinigung wurden sie in Puffer A resuspendiert, auf lineare Saccharosegradienten aufgelagert (10 - 30 % Saccharose in Puffer A, RNase-frei) und 1 h lang bei 40 000 Upm in einem Vertikalrotor (TV 850; 4°C) zentrifugiert. Das Absorptionsprofil der Gradienten bei 260 nm wurde in einer Durchflußzelle aufgenommen und die 70S-Material enthaltenden Fraktionen gesammelt. Die gereinigten 70S-Partikel wurden aus dieser Lösung sedimentiert (42 000 Upm/14 h/4°C) und in Puffer C resuspendiert (Tris-Chlorid pH 8, 20 mM; $MgCl_2$ 10 mM; KCl 40 mM; NH_4Cl 100 mM; DTT 2 mM). Nach 3 x 1 h Dialyse gegen den gleichen Puffer wurden die Ribosomen in Portionen aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Isolierung ribosomaler Untereinheiten wurden gereinigte 70S Ribosomen aus Methanococcus vanniellii in Puffer D suspendiert (20 mM Tris-Chlorid pH 7.5; 1 mM MgAc; 100 mM KCl; 500 mM NH_4Cl ; 2 mM DTT) und 10 min bei 38°C zur völligen Dissoziation der

Untereinheiten inkubiert. 30S- und 50S-Partikel wurden durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt (10 - 30 % Saccharose in Puffer D, RNase-frei) und isoliert wie für 70S Ribosomen beschrieben.

Als eine weitere Voraussetzung für die in vitro Systeme methanogener Bakterien wurde Transfer-RNA aus Zellen dieser Organismen nach von Ehrenstein (56) isoliert. Dazu wurden 50 ml-Portionen von S100-Extrakten aus Methanococcus vanniellii, Methanobacterium formicicum und Methanobacterium thermoautotrophicum mit Natriumacetat (pH 5.0) auf eine Endkonzentration von 2 % gebracht. Der Extrakt wurde mit zwei Volumina kalten Äthanols (p. A.) gemischt und über Nacht bei -20°C belassen. Der Nukleinsäuren-Niederschlag wurde durch Zentrifugation gesammelt (10 000 Upm/10 min) und getrocknet. Er wurde mit 10 ml kalter 1 M NaCl-Lösung versetzt und eine Stunde lang bei 0°C heftig gerührt. Ungelöstes Material wurde abzentrifugiert und noch einmal der NaCl-Behandlung unterworfen. Aus den vereinigten Überständen wurde die tRNA durch Zugabe von zwei Volumina kalten Äthanols (-20°C) ausgefällt. Das Präzipitat wurde sedimentiert und getrocknet. Die Transfer-RNA wurde in Tris-Chlorid-Puffer gelöst (10 mM, pH 8).

Die Standardprobe des in vitro Polyphenylalaninsynthesystems hatte ein Volumen von 200 µl und war folgendermaßen zusammengesetzt:

20 mM Tris-Chlorid pH 8; 10 mM Magnesiumchlorid; 40 mM Kaliumchlorid; 100 mM Ammoniumchlorid; 5 mM Dithiothreitol; 1 mM ATP und 0.5 mM GTP (beide auf pH 7 eingestellt); 1 mM Spermidin; 250 µg/ml Methanococcus vanniellii Transfer RNA; 0.02 mM L-(U-¹⁴C) Phenylalanin (10 mCi/mM); 400 µg/ml Polyuridylsäure oder, wo angezeigt, 5mg/ml poly(UG) (Basenverhältnis 4 : 1); 6 mM Phosphoenolpyruvat, Trinatriumsalz; 1.5 mg/ml Pyruvat-Kinase; 4 mg/ml Polyäthylenglykol 6000; 50 A₂₆₀/ml Methanococcus vanniellii 70S Ribosomen; 2 mg/ml Methanococcus vanniellii S100 Protein.

Anstelle von 70S-Ribosomen wurden auch 30S und 50S ribosomale Untereinheiten eingesetzt. Tris, Spermidin, ATP und GTP wurden zusammen als eine zehnfach konzentrierte Stammlösung gehandhabt. Phosphoenolpyruvat und Polyäthylenglykol 6000 wurden in fester Form zugegeben, Pyruvatkinase in flüssiger Lösung. Sämtliche anderen Komponenten wurden aus einzelnen Stammlösungen pipettiert, die steril-filtrierte in Hungate-Röhrchen aufbewahrt waren. Um überflüssigen Sauerstoff zu entfernen, wurde jede vor Gebrauch evakuiert.

Das Pipettieren der Tests sowie die Inkubation erfolgten unter sauerstoff-freien Bedingungen in der Handschuh-Box (95 % Stickstoff; 5 % Wasserstoff). Die Inkubation wurde unmittelbar nach Zugabe des S100-Extrakts zum Reaktionsansatz gestartet. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze mehrmals umgerührt und die Proben in einen vorgeheizten Thermoblock gestellt. Die Inkubation dauerte gewöhnlich 40 min. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Gläschen mit den Proben in einem Eiswasserbad abgekühlt und 2 ml 10%ige Trichloressigsäure-Lösung (0°C) zugegeben.

c) *Bestimmung des fehlerhaften Einbaus von Aminosäuren in Polypeptide*

Um Fehleinbau von Aminosäuren im poly(U)-abhängigen Translationssystem aus Methanococcus vanniellii zu messen, wurden die Translationsprodukte mit einer Mischung aus L-(U-¹⁴C)Tyrosin, L-(U-¹⁴C)Isoleucin und L-(U-¹⁴C)Serin markiert (je 0.5 mM, 12.5 mCi/mM). (¹²C)Phenylalanin wurde in einer Konzentration von 0.5 mM zugegeben.

d) *Das in vitro Polyphenylalanin-Synthesesystem von Methanobacterium formicicum*

Zellen von Methanobacterium formicicum wurden durch Passieren

einer French Press Zelle bei 16 000 psi aufgeschlossen. Die weitere Aufarbeitung und das Testsystem waren mit dem in b) für Methanococcus vanniellii beschriebenen bis auf die folgenden Ausnahmen identisch:

- (i) Die Reinigung der 70S-Ribosomen erfolgte in Puffer E (20 mM Tris-Chlorid pH 7.8; 25 mM $MgCl_2$; 30 mM NH_4Cl ; 2 mM DTT).
- (ii) Das Testsystem enthielt neben 70S Ribosomen und tRNA aus Methanobacterium formicicum auch E. coli tRNA (125 $\mu g/ml$).

IV) Versuche zur ppGpp-Synthese in vitro

Zur Messung der ppGpp-Synthese in vitro wurden Ribosomen aus Methanococcus vanniellii, Methanobacterium formicicum und E. coli wie von Haseltine et al. (57) beschrieben isoliert. Zur Gewinnung von hochsalzgewaschenen Ribosomen wurden 70S-Ribosomen in Puffer F aufgenommen (10 mM Tris-Acetat pH 7.8; 14 mM Magnesium-Acetat; 60 mM Kalium-Acetat; 0.5 M NH_4Cl ; 1 mM DTT) 2 h bei 4°C gerührt und wieder sedimentiert. Der Überstand wurde einer weiteren Zentrifugation unterworfen und dann als 0.5 M NH_4Cl -Waschfraktion verwendet. Das Sediment wurde nach zweimaligem weiteren Waschen in Puffer F resuspendiert und in Puffer F ohne NH_4Cl aufgenommen (hochsalzgewaschene Ribosomenfraktion).

Die Testansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt: 42 mM Tris-Acetat pH 7.8; 1.4 mM DTT; 11.4 mM Magnesiumacetat; 27 mM Ammoniumacetat; 0.55 GTP; 2.2 mM ATP; 10 mM Kaliumacetat. Zur Markierung der Produkte wurden pro Test 1.4 μCi α -(^{32}P)GTP eingesetzt. Es wurde eine Ribosomenkonzentration von 91 A_{260} Einheiten/ml gewählt; die Inkubation bei 37°C dauerte 40 min. Sie wurde beendet, indem das Reaktionsgefäß in Eiswasser gekühlt und heftig geschüttelt wurde. Der Ansatz wurde sofort mit einem gleichen Volumen 2 M Ameisensäure versetzt und abermals durchmischt. Das präzipitierte Material wurde abgetrennt (3 000 x g/

20 sek) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Auftrennung und Identifizierung der Produkte wurden unverzüglich 3 µl des Überstandes auf Macherey & Nagel Polygram PEI CEL 300 Dünnschichtchromatographie-Platten aufgetragen. Die Platten wurden entweder eindimensional mit 1.5 M KH_2PO_4 pH 3.4 oder in einem zweidimensionalen Trennsystem (Laufmittel der ersten Dimension: 3.3 M Ammoniumformiat und 4.2 % Borsäure, pH 7 mit Ammoniaklösung eingestellt; Laufmittel in der zweiten Dimension: 1.5 M KH_2PO_4 pH 3.4) entwickelt (53, 54). Die nach dem Lauf getrockneten Platten wurden über Nacht auf Kodak XOMat AR 50 Röntgenfilmen exponiert. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch Vergleichen ihres Laufverhaltens im zweidimensionalen Trennsystem mit dem von authentischen Nukleotiden.

Zur Bestimmung der Radioaktivität in den Nukleotiden wurden die entsprechenden Bereiche der Dünnschichtplatten mit Hilfe eines Spatels ausgekratzt. Mit je 5 ml Aqualuma Plus als Szintillator wurde die Radioaktivität einer jeden Probe in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

V) Konzentrationsbestimmungen

Nukleinsäuren wurden über die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Sie wurden mit Wasser so verdünnt, daß ihre A_{260} zwischen 0.1 und 0.3 lag. Für DNA-Konzentrationsbestimmungen wurde von einem Wert von 50 µg/ml für 1 A_{260} ausgegangen, für Bestimmungen der RNA-Konzentration von einem Wert von 42 µg/ml.

Bestimmungen der Proteinkonzentration wurden nach der Methode von Lowry et al. (58) durchgeführt; daneben kam die von Ehresmann et al. (59) beschriebene Methode zur Verwendung.

Liste von Chemikalien samt Bezugsquellen

L-(^{35}S)-Methionin, L-(4,5- ^3H)-Lysin, L-(U- ^{14}C)-Lysin, L-(U- ^{14}C)-Phenylalanin, L-(U- ^{14}C)-Tyrosin, L-(U- ^{14}C)-Isoleucin, L-(U- ^{14}C)-Serin, L-(5,6- ^3H)-Uracil, L-(4,5- ^3H)-Leucin waren von Amersham-Buchler, Braunschweig.

$^{32}\text{PO}_4$ und α -(^{32}P)-GTP wurden von NEN, Dreieich, bezogen.

FAD, NADP, poly(U) und poly(UG) stammten von Boehringer, Mannheim.

Pyridoxin, Folsäure und Phosphoenolpyruvat wurden von Calbiochem gekauft.

Die Antibiotika stammten von den in Klammern aufgeführten Firmen: Erythromycin, Tetracyclin (Boehringer, Mannheim); Verrucarín (Leo Pharmaceuticals, Ballerup); Anisomycin (Pfizer, Groton), Cycloheximid, Chloramphenicol, Hygromycin B, Neomycin und Streptomycin (Serva, Heidelberg); Gentamicin, Ampicillin (Sigma, München); Tiamulin (G. Högenauer, Sandoz, Wien); Virginiamycin (Smith-Kline RiT, Genval); Ricin (Paesel, Frankfurt); Thiostrepton (von Heyden GmbH, Regensburg); Pseudomonadinsäure (Beecham, Neuss).

Sämtliche anderen verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A..

C) ERGEBNISSE

I) Regulation der Bildung von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, Threonyl-tRNA-Synthetase und Translations-Initiationsfaktor 3 aus E. coli

a) In vivo Untersuchungen

1. Regulation in Abhängigkeit von der Wachstumsrate

Seit den Arbeiten von Maaløe und Kjeldgaard (7, 1) ist bekannt, daß die Synthese von Ribosomen in exponentiell wachsenden E. coli-Zellen in enger Korrelation zur Wachstumsgeschwindigkeit stattfindet. Wie Untersuchungen von Pedersen et al. (60) zeigten, wird diese "Metabolische Regulation" nicht nur bei der Bildung ribosomaler Proteine, sondern auch der einiger Enzyme und Faktoren des Translationsapparates beobachtet. Um nun weiteren Aufschluß zu erhalten, ob sämtliche zum Translationsapparat gehörenden Proteine, vor allem auch die Gruppe der Initiationsfaktoren, metabolisch reguliert sind, wurde die Synthese von IF-3, PheRS und ThrRS näher untersucht.

Dazu wurde mittels Doppelmarkierungstechnik und anschließender zweidimensionaler Auftrennung der Zellproteine die relative Menge eines jeden einzelnen Proteins im Verhältnis zum Gesamtprotein bestimmt. Dies geschah an vier mit unterschiedlicher Rate wachsenden Kulturen, so daß für jedes Einzelprotein die Wachstumsratenabhängigkeit ermittelt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt.

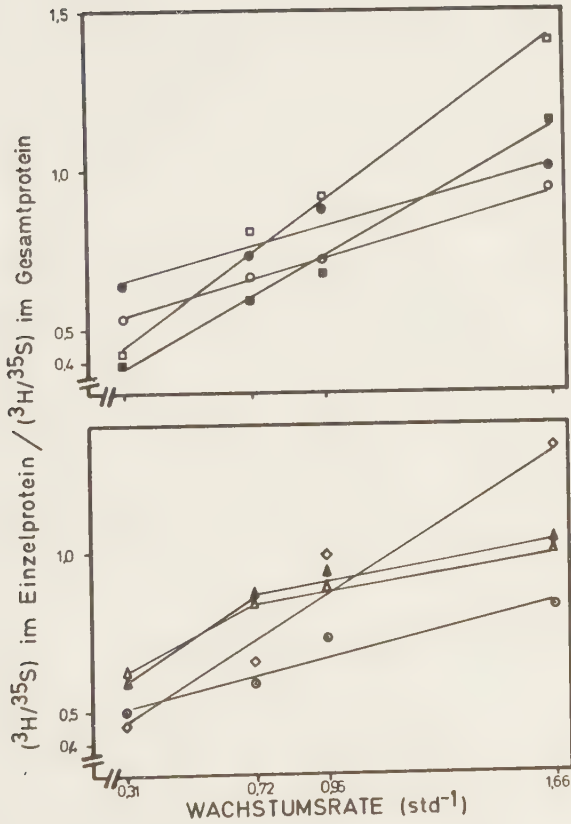


Abbildung 1:

Wachstumsratenabhängigkeit der Bildung von Proteinen des *E. coli*-Translationsapparates

- : IF-3₁ + IF-3_s ○: EF-Tu □: r-Protein L3
- : r-Protein L5 △ und ▲: α- und β-Untereinheiten der PheRS
- ◇: ThrRS ⊙: IleRS

Sie zeigen, daß die drei untersuchten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zwar eine Abhängigkeit ihrer Bildung von der Wachstumsrate erkennen lassen, jedoch in sehr verschiedenem Maße. Die Synthese von ThrRS ist weit mehr "metabolisch reguliert" als die von IleRS oder PheRS. In Übereinstimmung mit früheren Daten verläuft die Bildung der PheRS auch biphasisch: bei niedriger Wachstumsrate war die Abhängigkeit stärker ausgeprägt, bei hoher Wachstumsgeschwindigkeit geringer (48).

Initiationsfaktor 3 der Proteinsynthese wird, wie weiter unten ausgeführt, in zwei Formen in den Zellen vorgefunden: einer kurzen Form IF-3_s und einer langen Form IF-3_l (siehe unten). Der zelluläre Anteil der Summe beider Formen ist im oberen Teil der Abbildung 1 wiedergegeben. Sie zeigt, daß IF-3 in gleicher Weise metabolisch reguliert wird wie einer der Elongationsfaktoren, EF-Tu. Über den Bereich der untersuchten Wachstumsraten findet dabei eine weniger starke Variation des zellulären Gehalts statt, als für ribosomale Proteine beobachtet wird.

2. Gen-Dosis-Abhängigkeit der Synthese

Die Untersuchung der Gendosis-Abhängigkeit der Bildung eines Proteins erlaubt eine Aussage, ob seine Synthese "autoreguliert" wird oder nicht. Für ribosomale Proteine wurde eine solche Autoregulation nachgewiesen; eine Erhöhung der Gendosis führt zu keiner vermehrten Synthese (61, 62). Für Initiationsfaktoren lagen zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch keine Daten vor, für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nur für einige wenige Enzyme (63). Die Resultate der Gendosis-Analyse der Bildung von IF-3 waren auch im Hinblick auf die Frage interessant, in welchem Bereich die Stöchiometrie IF-3:Ribosom in der Zelle variiert werden kann, ohne daß Hemmung der Proteinsynthese erfolgt. Eine Funktion von IF-3 liegt ja in der Ribosomendissoziation (64, 65); es wäre deswegen anzunehmen, daß zu hohe IF-3:Ribosomen-Verhältnisse eine Hemmung der Proteinsynthese bewirken.

Zu diesem Zweck wurde die IF-3-Synthese in den Colistämmen AB1361 und AB1361-8 gemessen. AB1361-8 ist lysogen für $\lambda p2$ und trägt somit das Strukturgen für IF-3 in zwei Kopien (63, 66). Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Relative Mengen von IF-3 und Vergleichsproteinen in AB1361 und AB1361-8

Protein	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ im Einzelprotein	
	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ im Gesamtprotein	
	AB1361	AB1361-8
IF-3	0.531	1.12
EF-Tu	1.21	1.19
EF-G	1.13	1.08
PheRS- α	0.357	0.69
PheRS- β	1.27	1.59
IleRS	1.12	1.00
S1	1.23	1.29
L1	1.27	1.33
L5	1.36	1.41

Sie zeigen, daß IF-3 im Stamm AB1361-8 in etwa zweifacher Menge - verglichen mit dem Elternstamm - vorlag. Ähnlich überproduziert wurden auch die beiden Untereinheiten der PheRS, deren Strukturgene ebenfalls im E. coli-DNA-Anteil des $\lambda p2$ -Phagen enthalten sind. Der Spiegel aller anderen untersuchten Proteine in den beiden Stämmen war gleich.

Einen zusätzlichen Hinweis, daß IF-3 stabil überproduziert wird, erbrachte ein Versuch, der mit gleichem Ansatz, aber mit einem

anderen Stammpaar durchgeführt wurde: E. coli RR1/pHWO enthält das EcoRI-HindIII-Fragment aus λ p2 in das Multicopyplasmid pBR322 inseriert (R. Wirth). Das Autoradiogramm in Abbildung 2 veranschaulicht, daß - verglichen mit dem haploiden Elternstamm - IF-3 in RR1/pHWO in mehrfach höherer Menge vorliegt.

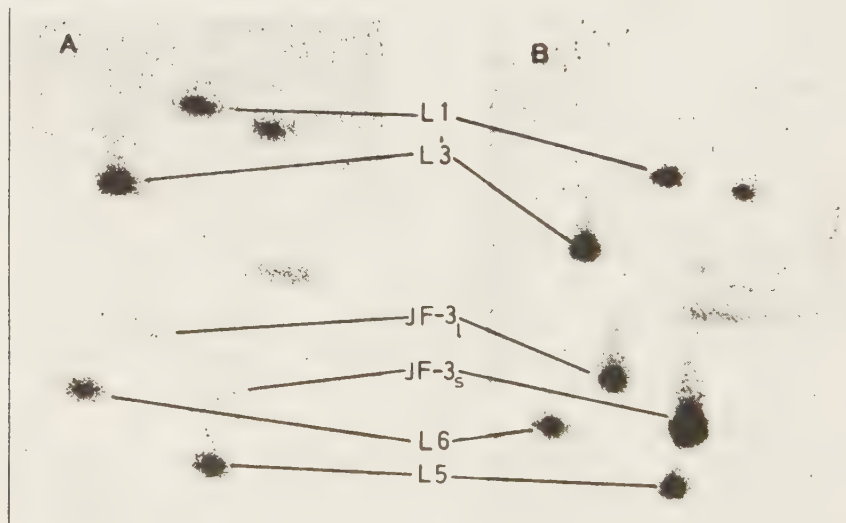


Abbildung 2:

Verteilung von IF-3₁ und IF-3_s in RR1/pHWO (B) und RR1 (A)

Das Autoradiogramm zeigt einen Ausschnitt einer Nonequilibrium-Auftrennung. Zur Orientierung sind die Positionen der r-Proteine L1, L3, L5 und L6 angegeben

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß IF-3 in E. coli überproduziert werden kann und damit nicht autoreguliert wird. Sie stehen im Einklang mit unlängst ebenfalls veröffentlichten Daten von Lestienne et al. (67).

Es war weiterhin interessant, daß der E. coli-Stamm mit dem IF-3

Strukturgenen auf einem Multicopyvektor die gleiche Wachstumsrate wie der haploide Elternstamm besitzt. Die Anwesenheit einer Überzahl von IF-3 Molekülen in der Zelle hat demnach keine Hemmung der Proteinsynthesekapazität zur Folge.

3. Synthese von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, Threonyl-tRNA-Synthetase und Initiationsfaktor 3 unter Aminosäuremangelbedingungen

Eine der maßgeblichen, das Wachstum von Eubakterien regulierenden Kontrollmechanismen ist das sogenannte "Stringent-Kontrollsystem" (siehe Einführung). Es bewirkt, daß bei abrupter Änderung der Medienbedingungen Bakterien sich rasch an die entsprechend veränderte Situation anpassen können. Stringent-Kontrolle setzt dabei primär an der Kapazität einer Zelle zur Proteinsynthese an (d.h. der Zahl der Ribosomen pro Zelle). Bei Veränderung des Mediums in Richtung eines Mangelzustandes ("Shift-down") wird die Ribosomensynthese solange eingestellt, bis deren Zahl sich derjenigen angepaßt hat, die für die geringere Wachstumsrate charakteristisch ist. Im umgekehrten Fall ("Shift-up") erfolgt präferentielle Synthese.

Um die Regulation von PheRS, ThrRS und IF-3 durch das Stringent-Kontrollsystem zu untersuchen, wurden die temperatursensitiven Stämme NF536 und NF537 verwendet. Sie besitzen eine valS-Mutation, die für das temperatursensitive Wachstum verantwortlich ist, und sie sind isogen - mit Ausnahme des rel-Allels. Aminosäuremangel wurde durch Erhöhung der Temperatur auf einen Wert hergestellt, der das Wachstum partiell inhibiert (semi-restriktive Bedingungen). Die differentielle Syntheserate wurde bestimmt durch Vormarkierung der Kulturen mit (^{14}C)-Lysin bei permissiver Temperatur und Pulsmarkierung mit (^3H)-Lysin bei semirestriktiver Temperatur. Sie ergibt sich aus dem $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis für jedes einzelne Protein, geteilt durch das Isotopenverhältnis aus dem Gesamtextrakt (68, 69). Diese Messungen sind

somit normalisiert und nicht von der Ausbeute der Proteine nach der Gelelektrophorese abhängig.

Tabelle 3 zeigt die erhaltenen Resultate.

Tabelle 3: Relative differentielle Syntheseraten verschiedener Proteine nach 15 min bei 35,5°C im Vergleich zu 29,5°C

Protein	NF314 <u>valS</u> ⁺ / <u>relA</u> ⁺	NF536 <u>valS</u> ^{ts} / <u>relA</u> ⁺	NF537 <u>valS</u> ^{ts} / <u>relA</u> ⁺
Translations-Faktoren:			
IF-3	0.80	0.90	0.99
EF-Tu	1.13	0.60	1.22
EF-G	0.97	0.40	1.67
Aminoacyl-tRNA-Synthetasen:			
Threonyl-	1.29	1.51	0.98
Phenylalanyl(α)-	0.89	0.57	0.57
Isoleucyl-	0.80	0.69	0.70
Valyl-	0.98	0.93	1.11
Ribosomale Proteine:			
S1	1.12	0.59	1.60
L1	1.03	0.39	1.56
L3	0.99	0.36	1.42
L5	1.03	0.41	1.65
L6	1.06	0.41	1.43

Die Werte sind aus zwei Experimenten gemittelt und stellen das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis an Radioaktivität in jedem einzelnen Protein, geteilt durch das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis im Gesamtextrakt dar.

Diese Resultate können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- (i) Erhöhung der Temperatur führt zu drastisch verringerten Syntheseraten der gemessenen ribosomalen Proteine, von EF-G und EF-Tu im relA⁺-Stamm NF536. Im relA-Stamm NF537 ist die Syntheserate erhöht ("relaxed" Zustand).
- (ii) Die Gruppe der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zeigt auch hier ein heterogenes Regulationsmuster; ThrRS wird unter diesen Bedingungen verglichen mit dem Elternstamm (NF314) unvermindert, ja sogar mit leicht erhöhter Rate weitersynthetisiert. Die differentiellen Syntheseraten der übrigen untersuchten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen waren im temperatursensitiven relA⁺-Stamm NF536 mehr oder weniger stark reduziert.
- (iii) IF-3 wurde im stringent-kontrollierten Stamm nach dem Aminosäurenentzug unvermindert synthetisiert. Ähnlich wie ThrRS und IF-2B gehört IF-3 damit nicht zu den Proteinen, deren Synthese in Aminosäure-Mangelzuständen abrupt herabgesetzt wird (70, 71).

b) In vitro Translation

Das Endziel aller regulatorischen Studien liegt in der Analyse des entsprechenden Mechanismus im in vitro Transkriptions-/Translations-System. Sie erlaubt die Untersuchung der Expression isolierter Gene ohne pleiotrope Wechselwirkung mit interferierenden Reaktionen, wie sie bei physiologischen Untersuchungen die Regel sind.

1. Identifizierung der Genprodukte

Die Strukturgene der uns hier interessierenden Proteine (infC, thrS, pheS und pheT) sind im E. coli-DNA-Anteil des spezifisch transduzierenden Bakteriophagen λ p2 enthalten (63, 66, 72).

Mit λ p2-DNA als Matrize wurden in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem sämtliche genannten Gene exprimiert (71). Abbildung 3 zeigt ein Autoradiogramm eines Nonequilibrium-Gels, auf dem die λ p2-Genprodukte zweidimensional aufgetrennt sind.

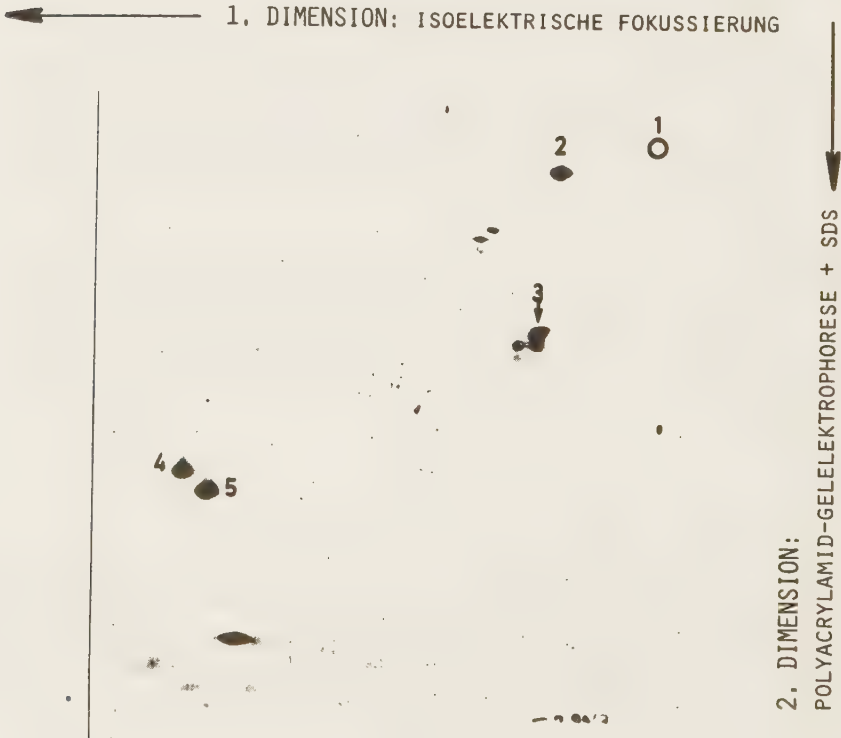


Abbildung 3:

Identifizierung der mit λ p2-DNA als Matrize synthetisierten *in vitro* Genprodukte. Die Flecken auf dem Autoradiogramm zeigen die Wanderungspositionen der Produkte im Nonequilibrium-Gelsystem nach O'Farrell (51) an.

1: PheRS-B 2: ThrRS 3: PheRS- α 4 und 5: IF3₁ und s

Diese Genprodukte wurden nach zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach O'Farrell (51) identifiziert durch

- (i) Koelektrophorese mit gereinigtem authentischem Protein und durch
- (ii) Vergleich der Wanderungsposition mit bereits veröffentlichten Koordinaten (73, 74).

2. Zeitabhängigkeit der in vitro-Bildung der $\lambda p2$ -Genprodukte

Die im ersten Teil dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigten Befunde aus der Literatur, wonach der Initiationsfaktor 3 in der E. coli-Zelle in zwei Formen vorkommt (75, 76). A priori kann nicht ausgeschlossen werden, daß für beide Formen eigene Strukturgene existieren. Der folgende Versuch wurde durchgeführt, um aus der zeitlichen Abfolge der in vitro Synthese dieser Proteine Aufschlüsse über ihre genetische Organisation zu erhalten.

Die Kinetik der in vitro Synthese der $\lambda p2$ -Genprodukte ist in Abbildung 4 dargestellt.

Im in vitro System wurden zwei Formen von IF-3 gebildet; sie wandern auf O'Farrell-Gelen in dieselben Positionen wie die zwei IF-3-Formen, die aus in vivo- Untersuchungen bekannt sind (76). In den ersten 40 min der Inkubation wurde fast ausschließlich die lange Form (IF-3_l) synthetisiert, während im weiteren Verlauf die kurze Form überwog (IF-3_s).

Die α -Untereinheit der PheRS und die ThrRS wurden über 30 bis 40 min hinweg linear gebildet. Danach wurde - zuerst von PheRS- α - ein Plateau erreicht. Die Syntheserate der ThrRS war dabei höher als die der PheRS- α -Untereinheit. Die Kinetik der Synthese von PheRS- β konnte in diesem Experiment wegen der variablen Ausbeute dieses Proteins in O'Farrell-Gelen (48) nicht ermittelt werden.

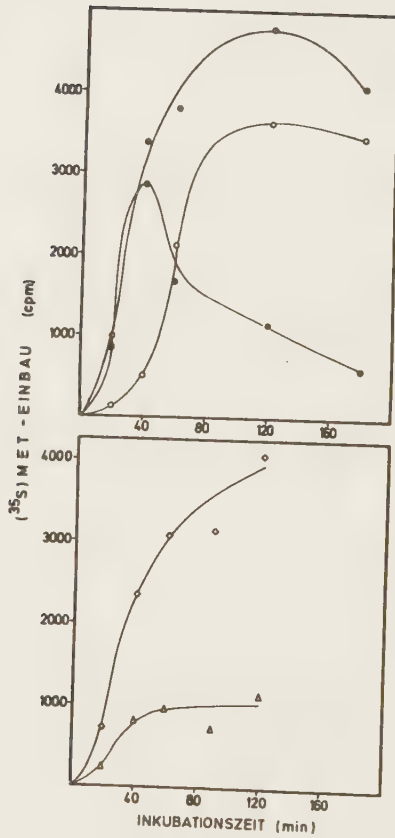


Abbildung 4:

Zeitabhängigkeit der in vitro Synthese der $\lambda p2$ -Genprodukte.

●: IF-3₁ ○: IF-3_s ⊙: IF-3_{1+s} ◇: ThrRS △: PheRS-α

3. Beeinflußt IF-3 seine eigene Synthese autoregulatorisch?

Die vorangehend geschilderten in vivo-Untersuchungen haben gezeigt, daß IF-3 gendosis-abhängig synthetisiert wird. Im Gegensatz zur Bildung ribosomaler Proteine scheint die Synthese dieses Initiationsfaktors demnach keiner autogenen Kontrolle zu unterliegen. Dies wurde in den nachfolgend beschriebenen Transkriptions-/Translations-Untersuchungen voll bestätigt: Gereinigtes IF-3-Protein wurde zum λ p2-abhängigen in vitro System in einem Konzentrationsbereich bis zu 40 μ g/ml gegeben (bei dem zugesetzten IF-3 handelte es sich um die lange Form). Die Synthese der λ p2-Genprodukte unter diesen Bedingungen wurde bestimmt.

Abbildung 5 demonstriert, daß die Netto-Synthese von IF-3 (kurze plus lange Form) auch nach Erhöhung der IF-3-Konzentration auf bis zu 40 μ g/ml nur mäßig inhibiert wurde. Doch ging mit der Erhöhung der IF-3-Konzentration eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen langer und kurzer IF-3-Form zugunsten der kurzen Form einher. Die Synthese der anderen λ p2-Genprodukte wurde durch die erhöhte IF-3-Konzentration nicht erniedrigt, dagegen wurde der (35 S)Methionin-Einbau in Gesamtprotein um mehr als 30 % gehemmt.

c) Einfluß von ppGpp auf die in vitro Expression der Struktur-gene von Initiationsfaktor 3, Threonyl-tRNA-Synthetase und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase.

ppGpp stellt - neben cyclischem AMP - den wohl wichtigsten sekundären Messenger der Eubakterienzelle dar. B. Ames hat für dieses unübliche Guanosinnukleotid den Ausdruck "Alarmon" geprägt (77), um damit seine vielfachen physiologischen Effekte zu kennzeichnen. Sowohl metabolische Kontrolle als auch Stringent-Kontrolle der Proteinsynthese sollen über diesen Effektor gesteuert werden (78). Sein Einfluß auf die Genexpression kann im in vitro Transkriptions-/Translations-System nachvollzogen werden

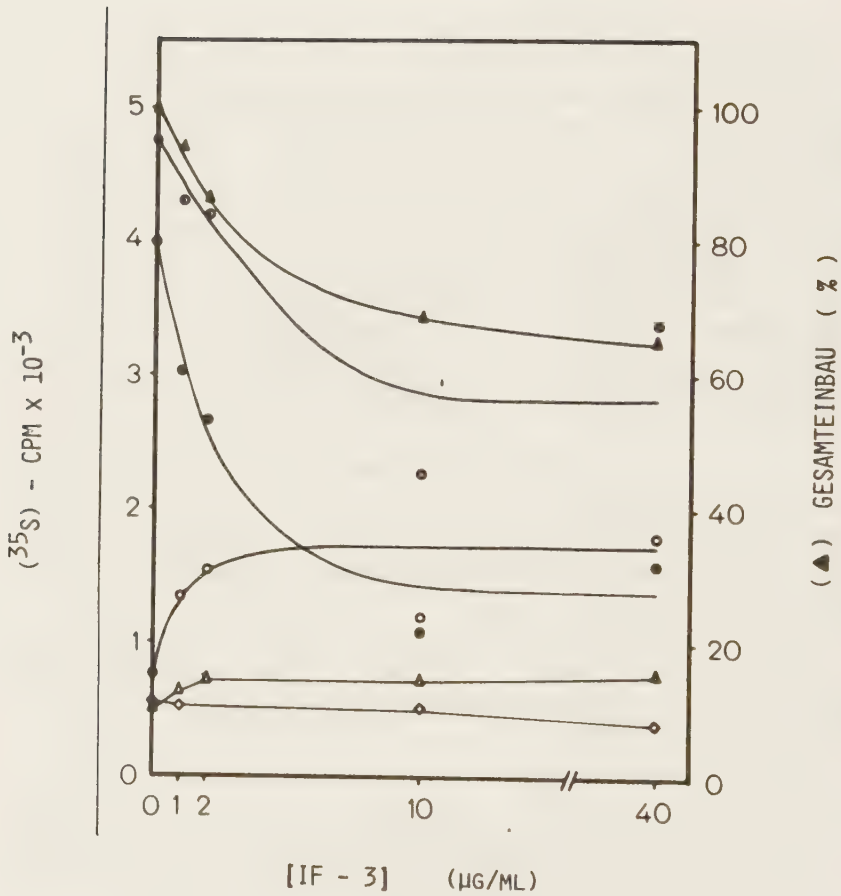


Abbildung 5:

Einfluß von zugesetztem IF-3-Protein (lange Form) auf die in vitro Synthese der $\lambda p2$ -Genprodukte.

●: IF-3₁ ○: IF-3_s ◐: IF-3_{1+s} ◇: ThrRS
 Δ: PheRS-α ▲: Gesamtsynthese

(79); er wurde für die Synthese von ThrRS, PheRS und IF-3, kodiert von λ p2-DNA, untersucht.

Dem System wurde dazu ppGpp in Mengen zugesetzt, die dem Vorkommen dieses Nukleotids in der Zelle unter Stringent-Bedingungen entsprechen (80). Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, wurde die Synthese der λ p2-Genprodukte unterschiedlich beeinflusst: ppGpp hemmte die in vitro-Bildung von IF-3 um 90 %, wenn es in einer Konzentration von 0.4 mM vorlag. Im Fall der untersuchten anderen λ p2-Genprodukten war in Gegenwart von 0.4 mM ppGpp keine oder nur schwache Hemmung der Synthese zu verzeichnen. Dagegen wurde die Bildung der beiden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen durch ppGpp in geringen Konzentrationen (0.1 bis 0.2 mM) stimuliert. Der Grad der Stimulierung machte bei ThrRS mehr als 200 % aus und war bei PheRS- α mäßig, aber signifikant, wie in mehreren, unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt werden konnte.

Zusammenfassung der Untersuchungen zur Regulation der Synthese von Threonyl-tRNA-Synthetase, Phenylalanyl-tRNA-Synthetase und Initiationsfaktor 3 in Escherichia coli:

Die geschilderten Ergebnisse haben gezeigt, daß die einzelnen Komponenten des Translationsapparates von E. coli einer - je nach Funktion - verschiedenen Regulation unterliegen:

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen werden wachstumsraten-abhängig gebildet. Sie unterliegen keiner Stringent-Kontrolle in vivo; ihre Synthese scheint nicht autoreguliert zu werden.

Initiationsfaktor 3 der Proteinsynthese wird, ähnlich wie Aminoacyl-tRNA Synthetasen, metabolisch reguliert. Autoregulation und Stringent-Kontrolle scheinen nicht vorzuliegen.

Elongationsfaktor Tu wird schwach "stringent" reguliert (79); der Grad der metabolischen Regulation gleicht derjenigen der

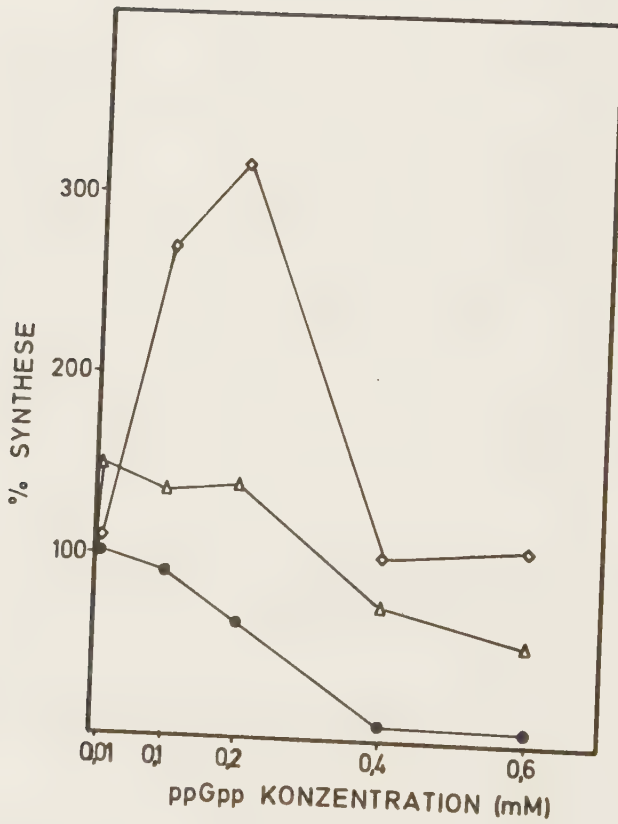


Abbildung 6:

Einfluß von ppGpp auf die in vitro Synthese der λ p2-Genprodukte.

○ : IF-3 (lange plus kurze Form) ◇ : ThrRS Δ : PheRS- α

Aminoacyl-tRNA Synthetasen (70).

Ribosomen und *Elongationsfaktor G* schließlich unterliegen einer strikten Stringent-Kontrolle, und ihre Synthese wird über einen weiten Bereich wachstumsraten-abhängig variiert (70). Autoregulation konnte für alle Proteinkomponenten des Ribosoms und für EF-G nachgewiesen werden (81).

II) Untersuchungen zum Vorkommen von ppGpp in Archaeobakterien

In vivo und in vitro Untersuchungen der Regulation der Komponenten des Proteinsyntheseapparates von Eubakterien lieferten ein bereits relativ vollständiges Bild der beteiligten Mechanismen und ihrer Zusammenwirkung (Review siehe 82).

Für Eukaryonten liegen solche Daten kaum, für Archaeobakterien überhaupt nicht vor. Im Rahmen der Untersuchungen unseres Labors über Struktur und Funktion des Translationsapparates von Archaeobakterien haben wir deswegen begonnen, diese Studien auf die Organismen des Archaeobakterienreiches auszudehnen.

Eine erste Fragestellung, die wir dabei beantworten wollten, war, ob Archaeobakterien unter entsprechenden physiologischen Bedingungen das "Alarmon" ppGpp zu synthetisieren vermögen, oder ob sie ähnlich wie Eukaryonten (25) nicht dazu in der Lage sind.

a) Versuch zum Nachweis von ppGpp in Halobacterium halobium unter Aminosäuremangel- beziehungsweise Energiemangelbedingungen.

ppGpp liegt in Eubakterien-Zellen während des exponentiellen Wachstums in niedrigen Basalkonzentrationen vor. Erst wenn die Bakterien Streß-Situationen, wie dem Mangel einer essentiellen Aminosäure ausgesetzt werden, findet eine Anhäufung dieses Nukleotids bis zu einer Konzentration von 1 mM statt (80). Um die Existenz dieses mutmaßlichen "Alarmons" (77) in diesen Organismen nachzuweisen, wurden als erstes nun Halobakterien Bedingungen

des Aminosäuren- oder Energiemangels unterworfen.

Um Aminosäuremangelbedingungen hervorzurufen, wurde zu exponentiell wachsenden Halobacterium halobium-Kulturen Pseudomonadinsäure gegeben. Aus Arbeiten an E. coli ist dieses Antibiotikum als ein Wirkstoff bekannt, der spezifisch die Beladung der tRNA_{Ile} durch Isoleucyl-tRNA-Synthetase verhindert (83). Den durch Pseudomonadinsäure ausgelösten Mangelzustand an beladener tRNA beantworten E. coli-Wildtyp (rel⁺) Zellen mit dem unmittelbaren Einstellen der RNA-Synthese und dem gleichzeitigen Anhäufen von ppGpp (83).

Um "stringent"-Bedingungen in Archaeobakterien studieren zu können, mußte jedoch zunächst untersucht werden, ob Pseudomonadinsäure (i) das Wachstum dieser Organismen hemmt und ob es (ii) den gleichen Wirkungsort wie in E. coli besitzt.

Die Wachstumshemmung von Archaeobakterien durch Pseudomonadinsäure demonstrieren die Abbildungen 7 und 8: Kulturen von Methanococcus vannielii wurden durch Pseudomonadinsäure bereits in Konzentrationen von 0.1 µg/ml im Wachstum inhibiert. Ähnlich eindrucksvoll wurde das Wachstum von Halobakterienkulturen durch Pseudomonadinsäure gehemmt (Abb. 8). Aus Abbildung 7 geht ferner hervor, daß der Hemmert die Isoleucyl-tRNA Synthetase ist. Die Spezifität der Wirkung wird durch die Tatsache bewiesen, daß die Anwesenheit von L-Isoleucin im Medium den wachstumshemmenden Effekt von Pseudomonadinsäure aufheben konnte (Einsatz-Zeichnungen in Abb. 7 und 8). Damit ist gezeigt, daß dieser Wirkstoff auch bei Archaeobakterien durch Inaktivierung der Isoleucyl-tRNA-Synthetase einen Mangel an beladener Isoleucyl-tRNA hervorruft.

Diese spezifische Wirkung von Pseudomonadinsäure wurde nun ausgenutzt, um zu prüfen, ob mit der Anhäufung von unbeladener tRNA_{Ile} eine Stimulation der Synthese von ppGpp einhergeht. Dazu wurden exponentiell in Gegenwart von ³²PO₄⁻⁻⁻ wachsende Kulturen von H. halobium mit Pseudomonadinsäure zu einer End-

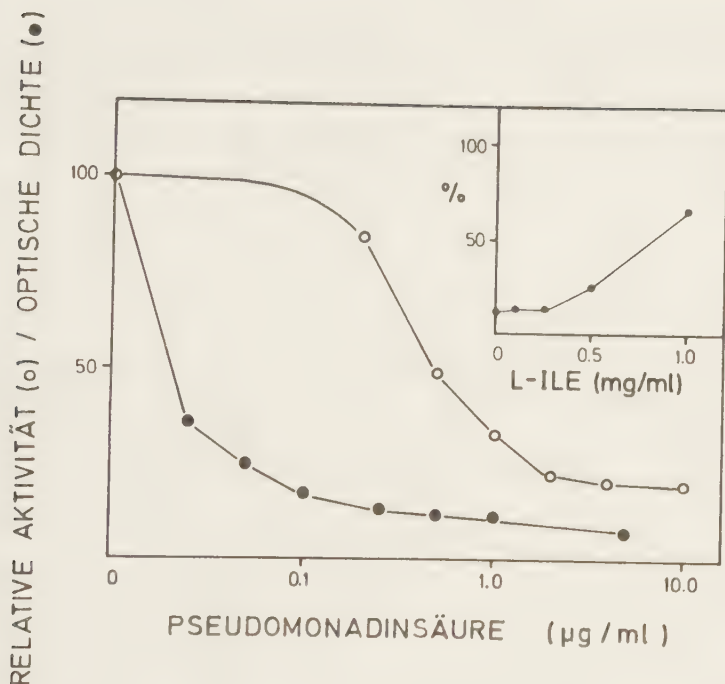


Abbildung 7:

Einfluß von Pseudomonadinsäure auf das Wachstum von *Mc. vannielii* (●) und auf die IleRS-Aktivität *in vitro* (○). Die Einsatz-Zeichnung zeigt die Aufhebung der Wachstumssthemmung (in Gegenwart von 1 µg/ml Pseudomonadinsäure) durch verschiedene Konzentrationen von L-Isoleucin im Medium.

konzentration von 100 µg/ml versetzt. Zum Zeitpunkt der Zugabe sowie bis zu 20 min danach wurden Proben genommen, mit Ameisensäure extrahiert, und die Guanodin-Nukleotide aus den Überständen dünnstschichtchromatographisch aufgetrennt. In einem Parallelansatz wurde anstelle von Pseudomonadinsäure der Energie-Entkoppler Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon (CCCP) einge-

setzt. Störungen des Energie-Haushaltes rufen bei Eubakterien (relA-unabhängige) ppGpp-Anhäufung hervor (84, 85). Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt: Eine Akkumulation von ppGpp wurde in keinem der beiden Ansätze beobachtet. Wie am Sinken des ATP-Spiegels in Abbildung 9 (A) abzulesen ist, war die Wirkung von CCCP dabei durchaus spezifisch.

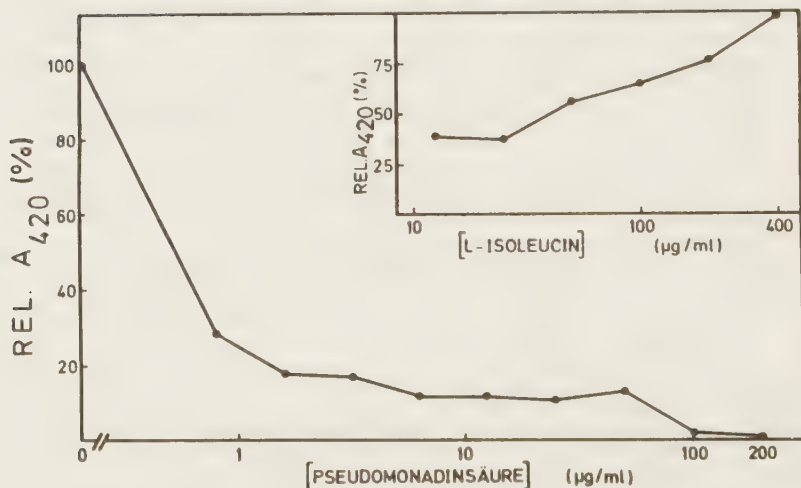


Abbildung 8:

Einfluß von Pseudomonadinsäure auf das Wachstum von *Halobacterium halobium*. Die Einsatz-Zeichnung zeigt die Aufhebung (in Gegenwart von 1 µg/ml Pseudomonadinsäure) durch verschiedene Konzentrationen an L-Isoleucin im Medium

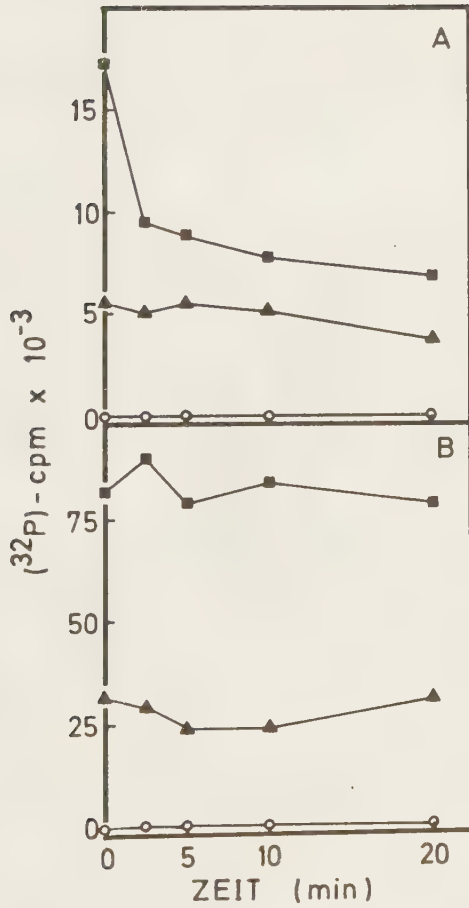


Abbildung 9:

Quantitative Bestimmung von ATP (■), GTP (▲) und ppGpp (○) aus Zellen von *Halobacterium halobium* vor und nach Zugabe von CCCP (A) beziehungsweise Pseudomonadinsäure (B).

b) Experimente zur in vitro Synthese von ppGpp an Ribosomen von methanogenen Bakterien.

Nachdem die oben beschriebene Suche nach ppGpp-Bildung in lebenden Zellen von Archaeobakterien zu keinem positiven Befund geführt hatte, sollten in vitro-Versuche weitere Aufschlüsse erbringen.

Die an E. coli auch in vitro gut untersuchte ppGpp-Bildung wird durch den Stringent Faktor katalysiert, einem Enzym, das mit Ribosomen assoziiert vorliegt. In Gegenwart von unbeladener tRNA und von Eubakterien-Ribosomen mit gebundener mRNA kann dieser Faktor eine Pyrophosphat-Gruppe von ATP auf GDP oder GTP übertragen, so daß ppGpp oder pppGpp resultieren (86, 87). Um zu sehen, ob Archaeobakterien-Ribosomen die strukturellen Voraussetzungen zur ppGpp-Bildung haben, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

70S-Ribosomen von Methanococcus vannielii und Methanobacterium formicicum wurden zusammen mit α -(^{32}P)GTP und unmarkiertem ATP inkubiert. Zum Nachweis von neugebildetem ppGpp wurde nach Ansäuerung mit Ameisensäure der Überstand durch ein- oder zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Nukleotide im Überstand wurden nach Autoradiographie identifiziert und durch Bestimmung der Radioaktivität quantitativ erfaßt. Das Autoradiogramm in Abbildung 10 zeigt die Wanderungspositionen von α -(^{32}P)GTP und den Reaktionsprodukten nach eindimensionaler und zweidimensionaler Auftrennung.

ppGpp und pppGpp konnten in solchen Ansätzen mit Ribosomen aus E. coli-Wildtyp-Zellen schon nach 5 bis 10 min Inkubationszeit im Überstand nachgewiesen werden. Abbildung 11 gibt die Kinetik dieser Reaktion wieder. In Abhängigkeit von der Ribosomenkonzentration und der Dauer der Inkubation konnte die in Form von α -(^{32}P)GTP eingesetzte Radioaktivität praktisch vollständig in pppGpp und ppGpp umgesetzt werden.

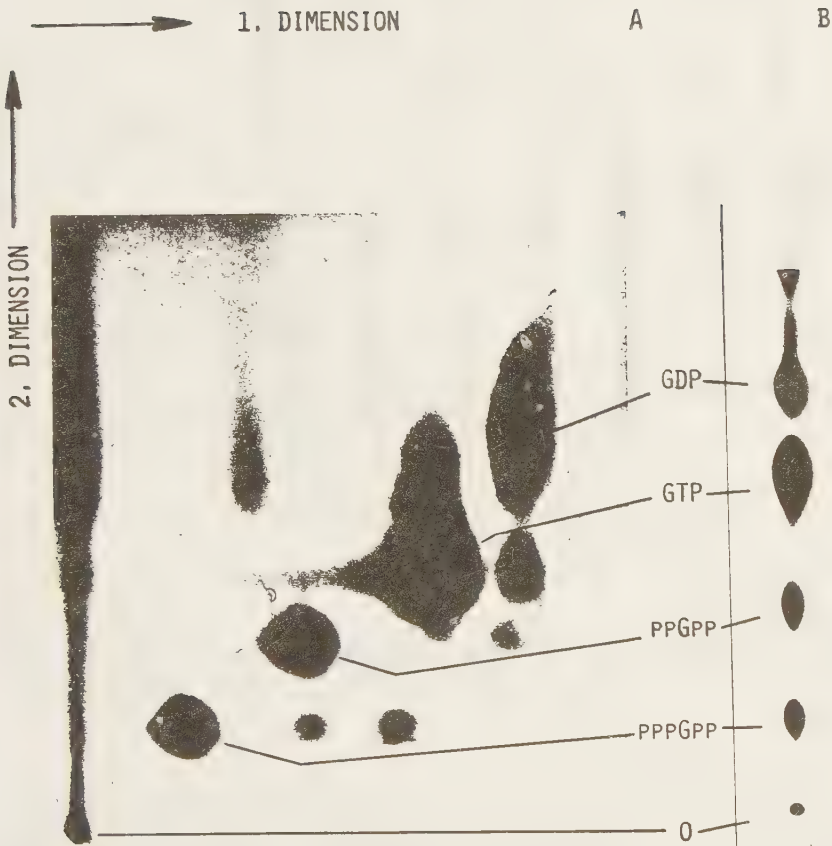


Abbildung 10:

Autoradiogramme von zweidimensionaler (A) bzw. eindimensionaler Dünnschichtchromatographie (B). Aufgetrennt wurden die Nukleotide aus einem Reaktionsansatz von *E. coli-rel*⁺-Ribosomen mit ATP und α -(³²P)GTP.

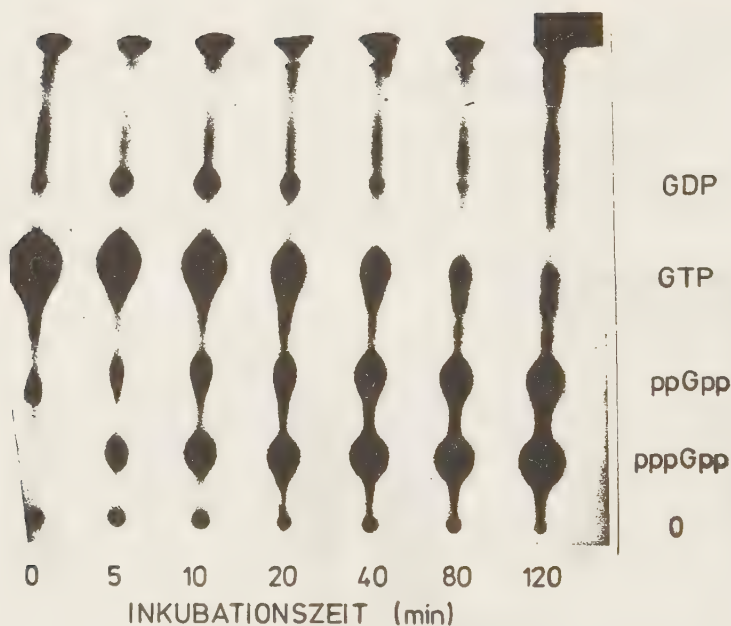


Abbildung 11:

Autoradiogramm einer Kinetik der in vitro Synthese von ppGpp und pppGpp aus α -(^{32}P)GTP und ATP an Ribosomen von E. coli B.

Entsprechende Versuche wurden nun mit Ribosomen methanogener Bakterien durchgeführt, die so präpariert waren, daß sie in einem in vitro Translationssystem (88) Aktivität zeigten. In Abbildung 12 sind die Resultate von Ansätzen mit 70S Ribosomen von Methanococcus vanniellii (B) und Methanobacterium formicicum (C) dargestellt. Grundsätzlich dienten in diesen Experimenten Parallelansätze mit gleichen Mengen an Ribosomen stringent-regulierter E. coli-Zellen als positive Kontrolle (Abb. 12/A).

Während Inkubation bis zu 90 min und mehr wurden ppGpp und pppGpp weder durch Ribosomen von Methanobacterium formicicum noch durch solche von Methanococcus vanniellii gebildet. In beiden

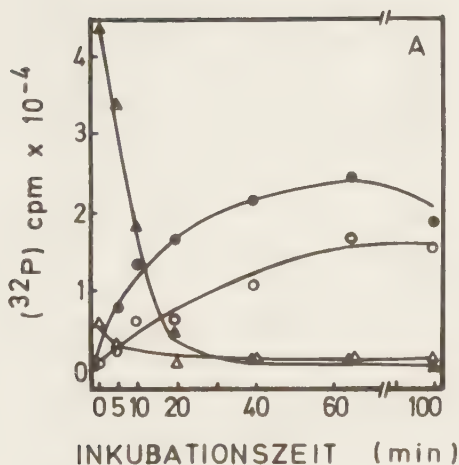


Abbildung 12/A:

Zeitabhängigkeit der Bildung von ppGpp und pppGpp an Ribosomen von *E. coli* B.

GTP (▲), GDP (△), pppGpp (●), ppGpp (○)

Fällen wurde zwar GTP abgebaut, doch wurde die dort verlorene Radioaktivität nahezu ausschließlich in GDP wiedergefunden. Auch der Zusatz von tRNA aus *Methanococcus vannielii* oder *E. coli* änderte nichts an diesem negativen Befund. Ein Mangel an mRNA im Ansatz sollte ebensowenig Grund dafür sein, da 70S Ribosomen von *Methanococcus vannielii* teilweise als 70S-mRNA-Komplex vorliegen (A. Böck, unveröffentlichte Ergebnisse).

Dieser negative Befund im *in vitro* ppGpp-Synthese-Ansatz könnte nun darauf beruhen, daß ppGpp zwar gebildet, aber durch eine überlagerte Phosphatase-Aktivität am Ribosom anschließend abgebaut wird. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden *E.coli*

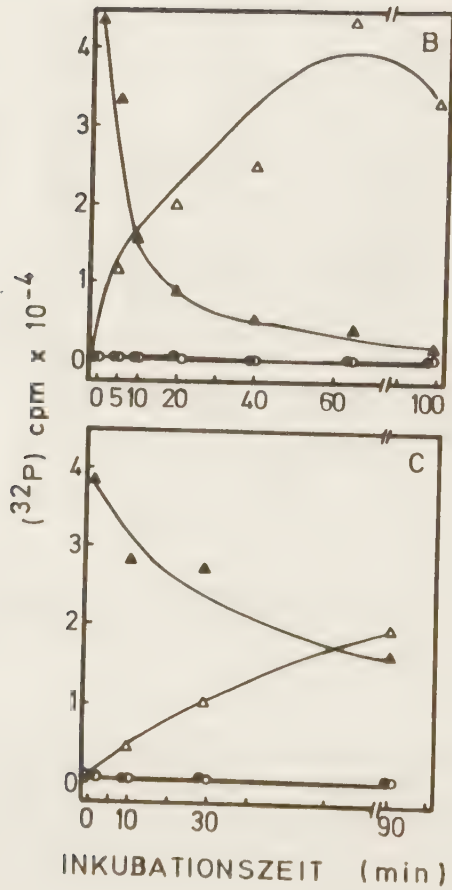


Abbildung 12/B und 12/C:

Kinetik der Bildung von ppGpp und pppGpp an Ribosomen von Mc. vannielii (B) und Mb. formicicum (C).

GTP (▲), GDP (△), pppGpp (●), ppGpp (○)

70S-Ribosomen mit ^{32}P -GTP zur ppGpp-Synthese inkubiert. Nach 40 min wurden Methanococcus vannielii-Ribosomen zum Reaktionsmix gegeben. Sofort und nach weiterer Inkubation wurden Proben genommen und die Menge an Radioaktivität in den vorsynthetisierten Nukleotiden bestimmt.

Abbildung 13/A zeigt das Ergebnis dieses Versuchs, Abbildung 13/B das der Kontrolle ohne Zusatz von Methanococcus-Ribosomen.

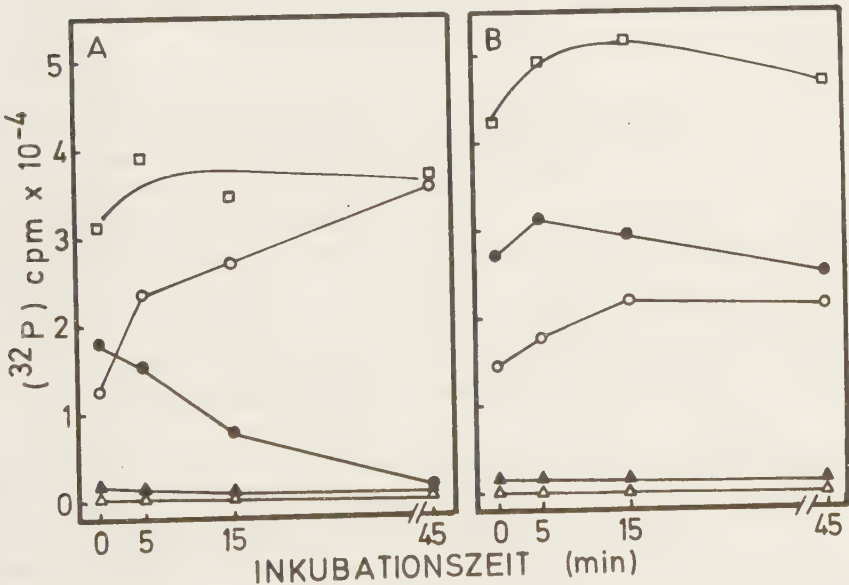


Abbildung 13:

Versuch zum Abbau von vorsynthetisiertem ppGpp in Gegenwart von Mc. vannielii-Ribosomen: ppGpp und pppGpp wurden in einem Ansatz mit E. coli (rel⁺), 70S Ribosomen und α -(^{32}P)-GTP vorsynthetisiert. Zum Zeitpunkt 0 min wurde der Ansatz geteilt: Eine Hälfte wurde nach Zusatz von Mc. vannielii-Ribosomen (A), die andere nach Zusatz eines entsprechenden Volumens Puffer A (B) weiterinkubiert. Die Menge an Guanosin-Nukleotiden in beiden Ansätzen wurde über einen Zeitraum von 45 min bestimmt.

GTP (▲), GDP (△), ppGpp (○), pppGpp (●), ppGpp + pppGpp (□)

Im Kontrollansatz (B) nahm die Menge an pppGpp plus ppGpp im ersten Drittel der Inkubation zu, danach nur unwesentlich ab. Auch in Anwesenheit von Methanococcus vanniellii-Ribosomen blieb die Summe an vorsynthetisiertem ppGpp und pppGpp praktisch unverändert; doch war eine Zunahme an ppGpp in einem Ausmaß zu beobachten, das dem Abbau an pppGpp entsprach.

c) Versuch zur heterologen ppGpp-Synthese an Ribosomen methanogener Bakterien, katalysiert durch 0.5 M NH_4Cl Waschfraktion von E. coli-Ribosomen.

Wie Untersuchungen aus den Arbeitsgruppen um Haseltine (89), Lipman (90) sowie von Cochran und Byrne (91) zeigten, kann das für die ppGpp-Synthese verantwortliche relA-Genprodukt (der sogenannte Stringent-Faktor) durch Hochsalzbehandlung von E. coli 70S Ribosomen abgetrennt werden. Wird dieser Stringent-Faktor zu Ribosomen aus relA⁻-Stämmen oder auch hochsalzgewaschenen Ribosomen anderer Eubakterien gegeben, so kann er an diesen ppGpp-Bildung katalysieren (89). An 80S Ribosomen eukaryontischer Organismen dagegen wirkt der Stringent-Faktor nicht (92).

Um zu prüfen, ob Ribosomen methanogener Bakterien für den Stringent-Faktor aus E. coli die strukturellen und mechanistischen Voraussetzungen zur ppGpp-Synthese erfüllen, wurden hochsalzbehandelte Ribosomen von Methanococcus vanniellii mit und ohne ribosomaler 0.5 M NH_4Cl -Waschfraktion aus E. coli inkubiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgelistet. (Die Daten wurden aus einem eindimensionalen Chromatogramm gewonnen und nicht gegen die Radioaktivität in der Spur korrigiert; Werte $\leq 1\%$ sind als Background zu vernachlässigen!)

Tabelle 4: *ppGpp-Synthese mit Hilfe von E. coli B 0.5 M NH₄Cl ribosomaler Waschfraktion*

Radioaktivität (%) in:	<u>E. coli B</u>		<u>Mc. vannielii</u>		<u>Mc. vannielii</u>
	70S	HSR	70S	HSR	50S
	-	r-Waschfr. +	-	r-Waschfr. +	+
<i>pppGpp</i>	0.4	8.6	0.45	1,3	0.5
<i>ppGpp</i>	0.5	7.1	0.7	8,9	1.0
<i>GTP</i>	91.0	69.0	29.9	34.6	78.2
<i>GDP</i>	7.2	15.3	68.0	54.1	20.5

HSR: Hochsalz-gewaschene Ribosomen

Der 100 %-Wert stellt die Summe der Ausbeute an Radioaktivität in den vier Nukleotiden dar.

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, wurde

- (i) an hochsalzgewaschenen Ribosomen von Methanococcus vannielii wie von E. coli *ppGpp* in Gegenwart einer ribosomalen 0.5 M NH₄Cl-Waschfraktion aus E. coli gebildet. Eine *pppGpp*-Anhäufung wurde am Methanococcus-Ribosom unter den gewählten Bedingungen (40 min Inkubation) nicht beobachtet.
- (ii) An den gereinigten ribosomalen 50S Untereinheiten aus Methanococcus vannielii wurde keine nennenswerte *ppGpp*-Bildung durch eine 0.5 M NH₄Cl-Waschfraktion aus E. coli B katalysiert.

Eine solche heterologe *ppGpp*-Synthese lief, wie Abbildung 14 zeigt, auch an 70S Ribosomen von Methanobacterium formicicum ab. Sie war im Ausmaß geringer als bei Methanococcus vannielii, doch signifikant: In Kontrollansätzen mit α -(³²P)GTP und E. coli 0.5 M NH₄Cl ribosomaler Waschfraktion, jedoch ohne Ribosomen, wurden weder *pppGpp* noch *ppGpp* gebildet (ohne Bild).

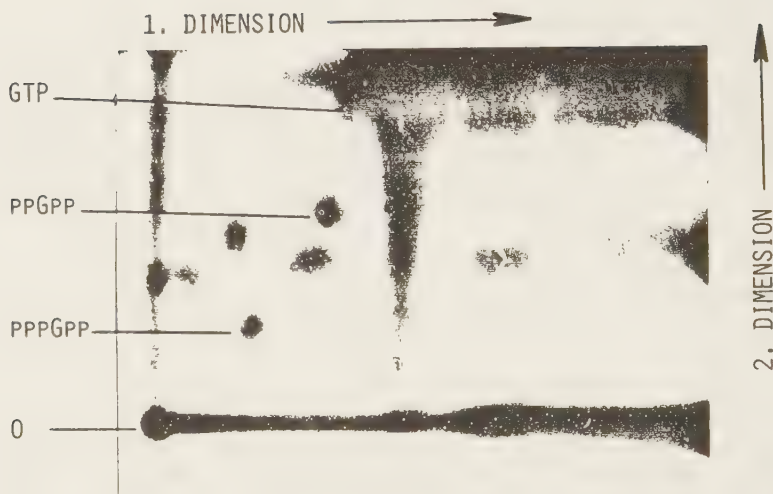


Abbildung 14:

Autoradiogramm einer zweidimensionalen Chromatographie eines ppGpp-Syntheseansatzes mit α -(^{32}P)GTP, 70S Ribosomen von Methanobacterium formicicum und 0.5 M NH_4Cl r-Waschfraktion aus E. coli B

Als nächstes wurde untersucht, ob die an Ribosomen methanogener Bakterien in der Anwesenheit der E. coli 0.5 M NH_4Cl ribosomalen Waschfraktion katalysierte ppGpp-Synthese auf der Aktivität des Stringent-Faktors (relA-Genprodukt) beruht. Ist dies der Fall, so sollte ppGpp-Bildung nicht beobachtet werden, wenn die Waschfraktion nicht von Ribosomen eines relA⁺-Stammes, sondern einer relA-Mutante (relaxed) verwendet wird.

Dazu wurden 70S Ribosomen aus Methanococcus vannielii mit einer 0.5 M NH_4Cl ribosomalen Waschfraktion aus Zellen von E. coli CP79 (relA) inkubiert. Abbildung 15 demonstriert, daß ppGpp an

Ribosomen von Methanococcus vannielii nur in Gegenwart einer ribosomalen Hochsalz-Waschfraktion aus rel⁺-Zellen, nicht aber mit einer aus relA-Zellen ablief.

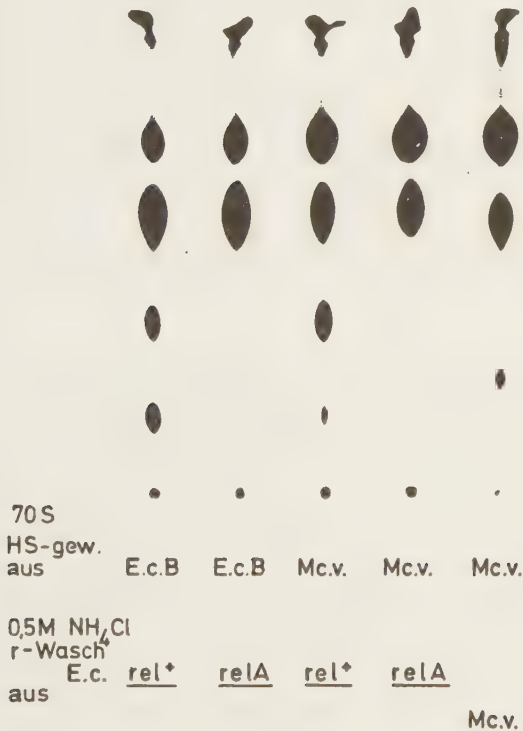


Abbildung 15:

Autoradiogramm einer eindimensionalen Chromatographie von homologen beziehungsweise heterologen ppGpp-Syntheseansätzen mit Ribosomen von E. coli B und Methanococcus vannielii.

HS-gew.: Hochsalz-gewaschen

III) Analyse der Sensitivität von Ribosomen methanogener Bakterien gegenüber Antibiotika

a) Aufstellung eines *in vitro* Polypeptidsynthese-Systems aus *Methanococcus vanniellii*

Die in Teil II der vorliegenden Arbeit beschriebenen Resultate haben gezeigt, daß die von uns untersuchten Archaeobakterien nicht die Fähigkeit besitzen, den in Eubakterien ubiquitär vorkommenden sekundären Messenger ppGpp in vivo zu synthetisieren. Die in vitro Analyse hatte dann ergeben, daß dies darauf beruht, daß methanogene Organismen keine dem "Stringent Faktor" der Eubakterien vergleichbare Enzymaktivität besitzen. Die Ribosomen dagegen haben die Fähigkeit, mit "Stringent Faktor" aus Eubakterien zu interagieren; mit anderen Worten, die für Eubakterien typische ribosomale Domäne, die ppGpp Synthese durch den "Stringent Faktor" induziert, ist in Archaeobakterien erhalten.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden nun weitere funktionelle Domänen des Ribosoms von methanogenen Bakterien auf ihre eubakteriellen beziehungsweise eukaryontischen Eigenschaften untersucht. Als biochemische Sonde dazu wurde Antibiotikaresistenz beziehungsweise -sensitivität herangezogen. Proteinsyntheseinhibitoren zeigen nämlich ein relativ gut konserviertes Wirkungsspektrum, was Hemmung der Proteinsynthese am eubakteriellen 70S beziehungsweise eukaryontischen 80S Ribosom anbelangt (93). Da die entsprechenden Antibiotikabindestellen fast ausschließlich durch mehrere ribosomale Komponenten gemeinsam gebildet werden (94,95), stellen sie ausgezeichnete molekulare Sonden für die Existenz der entsprechenden ribosomalen Domäne dar.

In vivo Hemmversuche allein können diese Information nicht liefern; Insensitivität gegenüber Antibiotika kann nämlich auf fehlender Aufnahme beruhen, Sensitivität, auf der anderen Seite, auf der Wirkung an anderer Stelle, als normalerweise angenommen

wird. In der Aussage eindeutige Resultate können aus diesen Gründen nur im in vitro System gewonnen werden. Als erstes wurde deswegen die Aufstellung eines Poly(U)-abhängigen in vitro Polypeptidsynthesesystems erarbeitet.

Da für Methanobacterium thermoautotrophicum Untersuchungen der intrazellulären Konzentrationen an Kalium, Magnesium und Natrium vorlagen (96), wurde zunächst mit einem zellfreien System dieses Stammes begonnen. Ein poly(U)-abhängiger Einbau von (^{14}C) Phenylalanin konnte jedoch weder mit S30-Extrakten von Methanobacterium thermoautotrophicum noch mit solchen von Methanococcus vannielii erreicht werden, unabhängig davon, ob die Präparation der Extrakte und die Inkubation der Testansätze in Gegenwart oder Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt worden war. Kontrollversuche ergaben, daß die PheRS-Aktivität in den Rohextrakten erhalten war; sogar bei Inkubation außerhalb der Anaerobenkammer wurde tRNA_{Phe} beladen.

Erst eine Auftrennung der S30-Extrakte mit weiterer Reinigung der Ribosomen brachte Aktivität im poly(U)-System, wie die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen (hier mit Material aus Mc. vannielii durchgeführt): Wurden Ribosomen lediglich aus dem S30-Extrakt sedimentiert, so zeigten sie noch keine Translationsaktivität. Erst nach Reinigung der 70S-Partikel über Saccharose-Dichtegradienten wurden aktive Ribosomen erhalten. Unter diesen Voraussetzungen machte es keinen Unterschied, ob die Inkubation der Tests unter aeroben oder anaeroben Bedingungen stattfand. Trotzdem wurden alle nachfolgend beschriebenen Versuche unter 95 % $\text{N}_2/5\%$ H_2 -Atmosphäre durchgeführt, um mögliche Sekundäreffekte von Sauerstoff auf die Translation - zum Beispiel auf Antibiotikasensitivität - auszuschließen.

Aufbauend auf der erzielten Grundaktivität wurden die Ionenbedürfnisse des Methanococcus-in vitro Translationssystems näher untersucht. Dabei stellte sich 40 mM Kaliumchlorid als geeignete Konzentration heraus (Abb. 15), Kaliumchlorid-Zugabe von mehr als

80 mM hemmte den (^{14}C)Phenylalanin-Einbau.

Tabelle 5: Poly(U)-abhängige Polyphenylalanin-Synthese durch Ribosomen von Methanococcus vanniellii

Versuchsbedingungen	Einbau von (^{14}C)Phenylalanin (cpm)
- S30 Extrakt, undialysiert	330
- S30 Extrakt nach Dialyse	340
- S100 Extrakt plus 70S Ribosomen (sedimentiert)	410
- S100 Extrakt plus 70S Ribosomen (durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt)	11 500
- S100 Extrakt plus gereinigte 30S und 50S ribosomale Untereinheiten	10 700
- S100 Extrakt plus gereinigte 70S Ribosomen plus E. coli tRNA anstatt Methanococcus-tRNA	340
- S100 Extrakt plus gereinigte 70S Ribosomen ohne poly(U)	275
- S100 Extrakt plus gereinigte 70S Ribosomen; Inkubation in Gegenwart von Sauerstoff	11 400

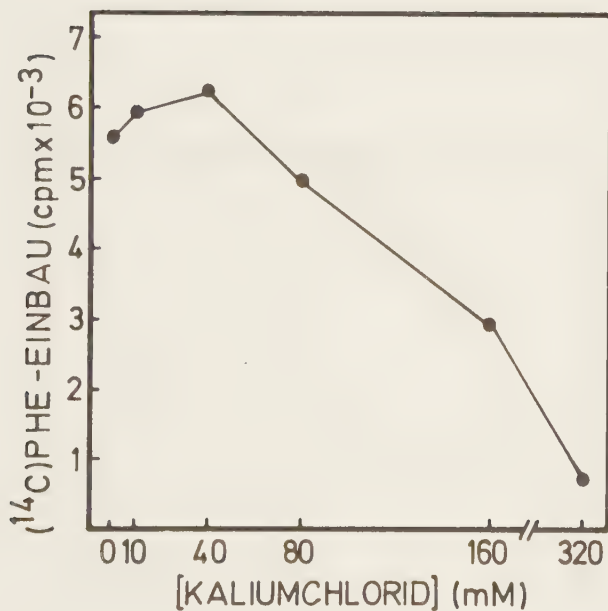


Abbildung 15:

Abhängigkeit des poly(U)-abhängigen *Methanococcus vannielii*-Polypeptid-Synthese-Systems von der Kaliumchlorid-Konzentration. Dem System war MgCl_2 (10 mM), aber kein NH_4Cl zugesetzt.

Für Magnesiumchlorid wurde ein distinktes Optimum von 10 mM gefunden (Abb. 16).

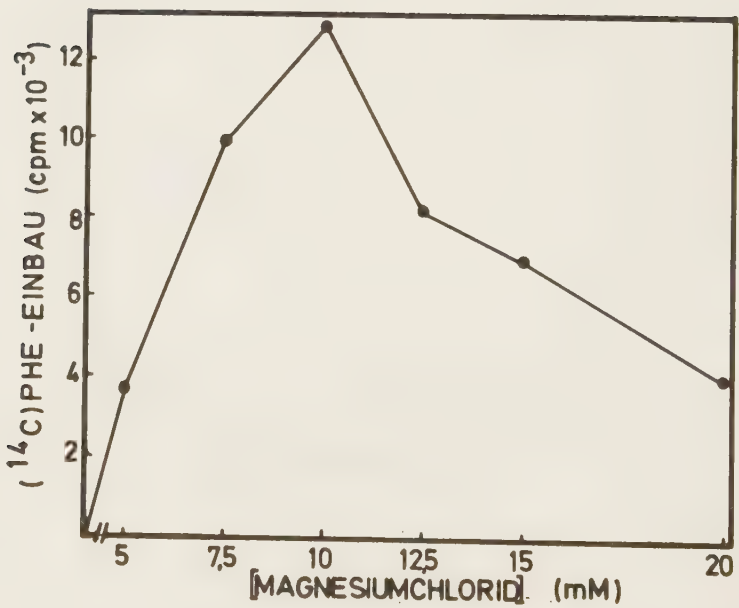


Abbildung 16:

Abhängigkeit des Methanococcus-Poly(U)-Systems von der Magnesiumchlorid-Konzentration.
 NH_4Cl und KCl waren diesem System in Konzentrationen von 120 mM beziehungsweise 40 mM zugesetzt.

Der Zusatz von Ammonium-Ionen in Form von Ammoniumchlorid war für die Aktivität im poly(U)-abhängigen System nicht essentiell. Beste Aktivität wurde jedoch in Gegenwart von 100 mM Ammoniumchlorid im System erzielt (Abb. 17).

Der Zeitverlauf der (^{14}C)Phenylalanin-Inkorporation im *Methanococcus*-System ist in Abbildung 18 wiedergegeben.

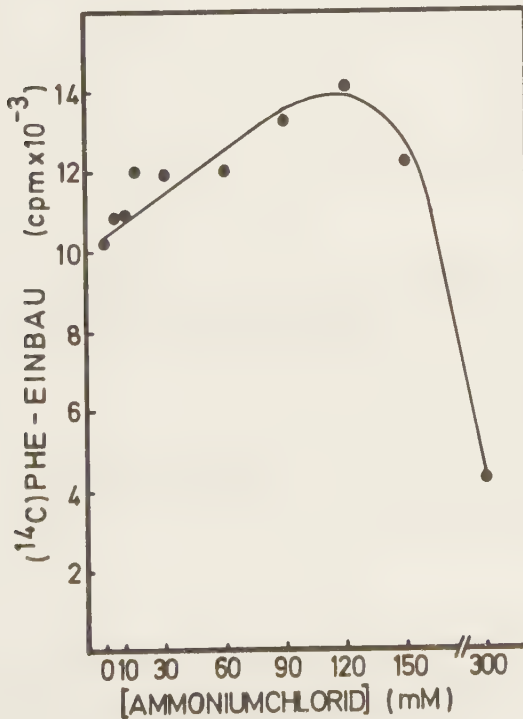


Abbildung 17:

Effekt der NH_4Cl -Zugabe auf die Aktivität des *in vitro* Translationssystems aus *Methanococcus vannielii*. Der Zusatz von MgCl_2 und KCl zu diesem System betrug 10 mM beziehungsweise 40 mM.

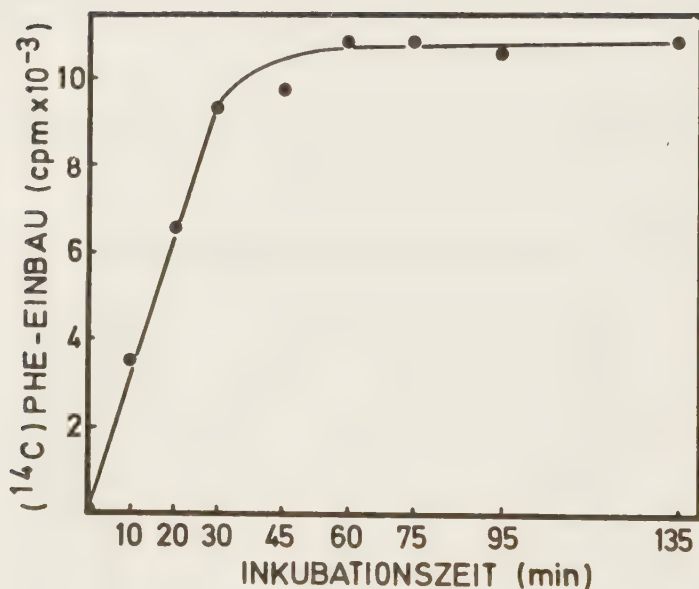


Abbildung 18:

Zeitabhängigkeit der poly(U)-abhängigen Polyphenylalaninsynthese im *Methanococcus*-System

Über 30 min hinweg war ein linearer Einbau zu verzeichnen; nach 1 h Inkubation war ein Plateau erreicht. Ein Netto-Abbau des gebildeten Polyphenylalanins wurde auch nach mehr als zwei-stündiger Inkubation nicht beobachtet (Abb. 18).

Wie für *Methanococcus vanniellii*, so wurde ein poly(U)-abhängiges Polyphenylalaninsynthesesystem auch mit Ribosomen aus *Methanobacterium formicicum* entwickelt. Es arbeitete unter den

Ionenbedingungen, die für *Methanococcus* als optimal herausgefunden worden waren; je nach Ribosomenpräparation wurde in diesem System ein (^{14}C)-Phenylalanineinbau zwischen 1 800 und 5 000 cpm/10 A_{260} -Ribosomen erzielt.

b) Der Einfluß von Proteinsynthesehemmern an 70S Ribosomen auf die in vitro Translation methanogener Bakterien

Für viele Proteinsynthese-Inhibitoren ist der Wirkort im bakteriellen Translationsapparat gut charakterisiert. Um zu sehen, wie sich die Ribosomen von Eu- und Archaeobakterien in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika gleichen, wurde der Einfluß verschiedener Translationshemmer auf das oben beschriebene in vitro Elongationssystem methanogener Bakterien untersucht.

Abbildung 19 gibt den Einfluß einiger Vertreter der Aminoglykosid-Antibiotika auf das Poly(U)-System von *Methanococcus vannielii* wieder. (Den 100 %-Aktivitäts-Wert stellt jeweils der in Abwesenheit von Hemmstoffen erreichte (^{14}C)-Phenylalanin-Einbau dar.) Selbst in hohen Konzentrationen vermochten Streptomycin und Hygromycin B das *Methanococcus*-Translationssystem kaum zu inhibieren. Dagegen zeigten Neomycin und Gentamicin eine deutliche Hemmwirkung: sie betrug in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ etwa 50 %.

Die Einwirkung weiterer Proteinsynthesehemmer auf das *Methanococcus*-poly(U)-System ist in Abbildung 20 wiedergegeben. Die Unempfindlichkeit dieses Systems gegenüber Tetracyclin fällt hier auf, einem Antibiotikum, für das Hemmwirkung in vitro auf 70S- wie auch 80S-Ribosomen berichtet ist (97, 98). Auch gegenüber Tiamulin, das an der 50S ribosomalen Untereinheit angreift (99, 100), war die Elongation am *Methanococcus*-Ribosom praktisch resistent. Eine prominente Hemmwirkung zeigten hingegen Virginiamycin und Thiostrepton, die beide die große Untereinheit des Bakterien-Ribosoms als Zielort haben (101, 102). Thiostrep-

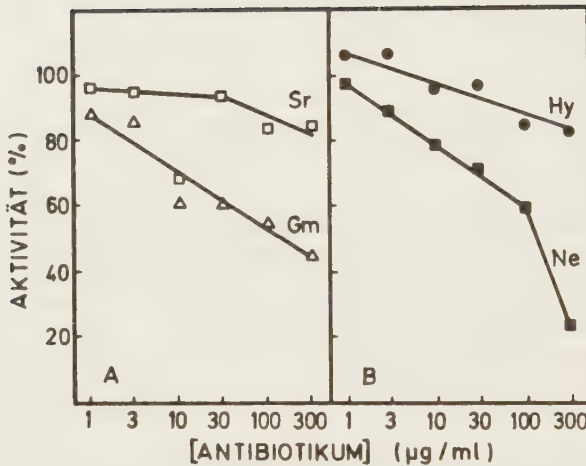


Abbildung 19:

Einfluß von Streptomycin (Sr), Gentamicin (Ge), Neomycin (Ne) und Hygromycin B (Hy) auf das poly(U)-abhängige Translations-system von *Methanococcus vannielii*

ton hatte auch im *Methanobacterium formicicum*-poly(U)-System eine 50 %-Hemmkonzentration von zirka 10 µg/ml (Abb. 22).

Chloramphenicol hat nach Berichten von Kucan und Lipman (1964) im *E. coli*-poly(U)-System keine inhibierende Wirkung, wohl aber, wenn poly(UG) anstelle von Polyuridylsäure als Matrize eingesetzt wird (103). Um Aussagen über die Chloramphenicol-Wirkung auf die Translation bei *Methanococcus* machen zu können, wurde

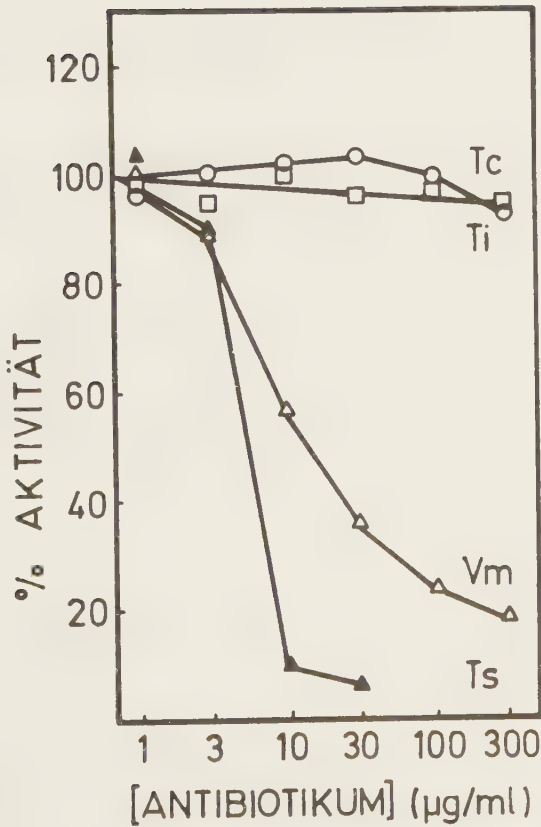


Abbildung 20:

Einfluß von Tetracyclin (Tc), Tiamulin (Ti), Virginiamycin (Vm) und Thiostrepton (Ts) auf die in vitro-Translation im *Methanococcus*-System

dieses Antibiotikum neben Erythromycin in einem poly(UG)-gesteuertem Elongationssystem getestet. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis dieser Hemmversuche. (Die mit S30 aus E. coli erhaltenen Werte sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet.) Weder Erythromycin noch Chloramphenicol inhibieren die in vitro Polypeptid-Synthese in Methanococcus vanniellii.

c) Untersuchung des Einflusses von 80S Proteinsynthese-Inhibitoren auf die poly(U)-abhängige Translation methanogener Bakterien

Ein überraschendes Ergebnis von in vivo Antibiotikums-Sensitivitäts-Studien war die Wachstumshemmung methanogener Bakterien durch Anisomycin, einem Antibiotikum, das bis dahin als ausschließlicher Hemmer der eukaryontischen Proteinsynthese gegolten hatte (104, 105). Dieser Befund veranlaßte uns, die Empfindlichkeit der Translation von Archaeobakterien gegenüber von 80S-Ribosomen in vitro zu überprüfen.

In Abbildung 22 sind die Resultate dieser Untersuchungen zusammengefaßt. Die Ergebnisse in Teil A wurden mit dem System aus Methanococcus vanniellii, die in Teil B mit dem aus Methanobacterium formicicum gewonnen.

Cycloheximid und Ricin zeigten, in Konzentrationen bis zu 300 µg/ml eingesetzt, in keinem der beiden Systeme hemmende Wirkung. Die Hemmung eines poly(U)-abhängigen Hefe-Systems durch Ricin ist zum Vergleich in Abbildung 22 mit unterbrochener Linie eingezeichnet. Für Verrucarín A wurde bei Methanobacterium formicicum inhibierende Wirkung gefunden, nicht aber bei Methanococcus. Eine unterschiedliche Sensitivität wurde auch gegenüber Anisomycin beobachtet. Die Methanococcus-Translation wurde durch Anisomycin in einer Konzentration von 300 µg/ml nur mäßig inhibiert, während schon 10 µg/ml Anisomycin für eine 50 %-Hemmung bei Methanobacterium formicicum ausreichten.

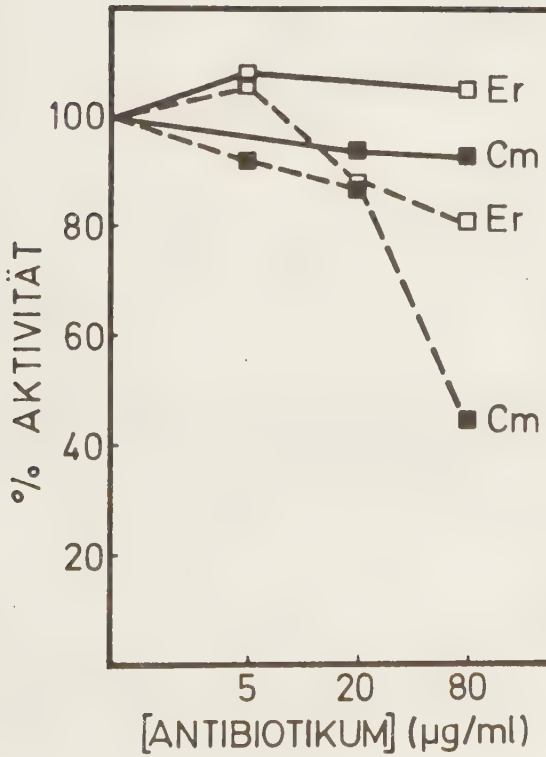


Abbildung 21:

Einfluß von Erythromycin (Er) und Chloramphenicol (Cm) auf das poly(UG)-abhängige Translationssystem von Methanococcus vannielii (—) beziehungsweise E. coli B (---)

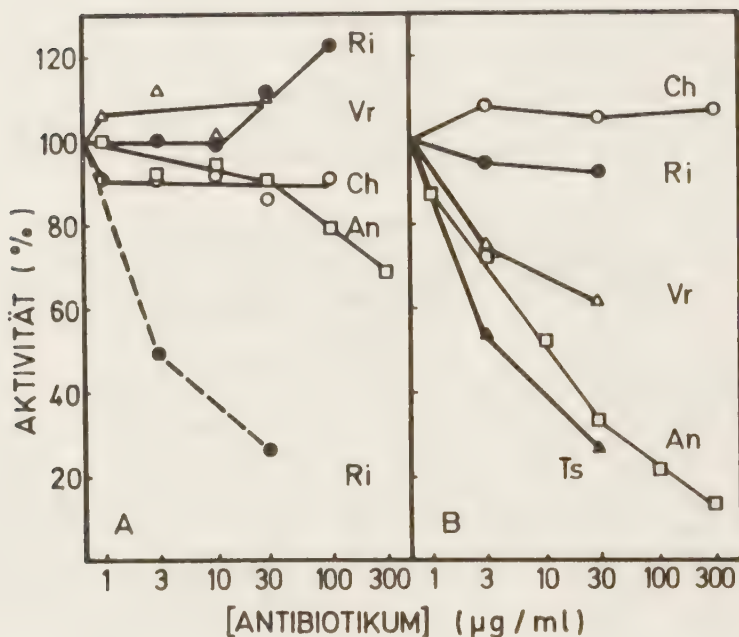


Abbildung 22:

Einfluß von Hemmstoffen der 80S-Translation auf die poly(U)-abhängige Polyphenylalanin-Synthese in *Mc. vanniellii* (A) und *Mb. formicicum* (B). Ch: Cycloheximid; Ri: Ricin; Vr: Verrucarin A; An: Anisomycin. Abbildung B zeigt zusätzlich die Hemmwirkung von Thiostrepton (Ts) auf die Translation von *Mb. formicicum*.

d) Bestimmung des Fehleinbaus von Aminosäuren in das poly(U)-abhängige Polypeptidsynthese-System aus *Methanococcus vanniellii*

Das zur Messung der Antibiotikumswirkung verwendete Poly(U)-System erfaßt die Effekte nur solcher Substanzen, die in den Elongationsschritt der Proteinsynthese eingreifen. Einwirkungen auf Initiation oder Termination der Peptidsynthese sind einer

Analyse damit nicht zugänglich.

Es ist jedoch möglich, mit Hilfe des Poly(U)-Systems den Einfluß auf den Fehleinbau der Aminosäuren in Proteine, das sogenannte "Misreading", quantitativ zu erfassen. Antibiotika, die Misreading induzieren, gehören fast ausschließlich der Klasse der Aminoglykoside an. Ihre Effektivität kann über Bestimmung des Misreading wesentlich besser analysiert werden, als durch Hemmung des Phenylalanineinbaus in Poly(U)-System.

Dazu wurde in Gegenwart einiger Aminoglykosid-Antibiotika der Einbau von (^{14}C)-Serin, -Tyrosin und -Isoleucin in säurelösliches Material des poly(U)-abhängigen Polyphenylalaninsynthesesystems von Methanococcus vanniellii bestimmt. Die Resultate sind in Abbildung 23 wiedergegeben: Streptomycin, das schon im Hemmtest ohne Wirkung geblieben war, löste auch keine Fehltranslation aus. Gentamicin und Hygromycin B stimulierten im Methanococcus-System auch in hohen Konzentrationen kaum oder nur mäßiges Misreading. Nur in Gegenwart von Neomycin wurde ein deutlicher, mit der Antibiotikumskonzentration zunehmender Fehleinbau gemessen, wie er in ähnlichem Umfang für Eubakterien-Systeme beschrieben worden war (106 - 108).

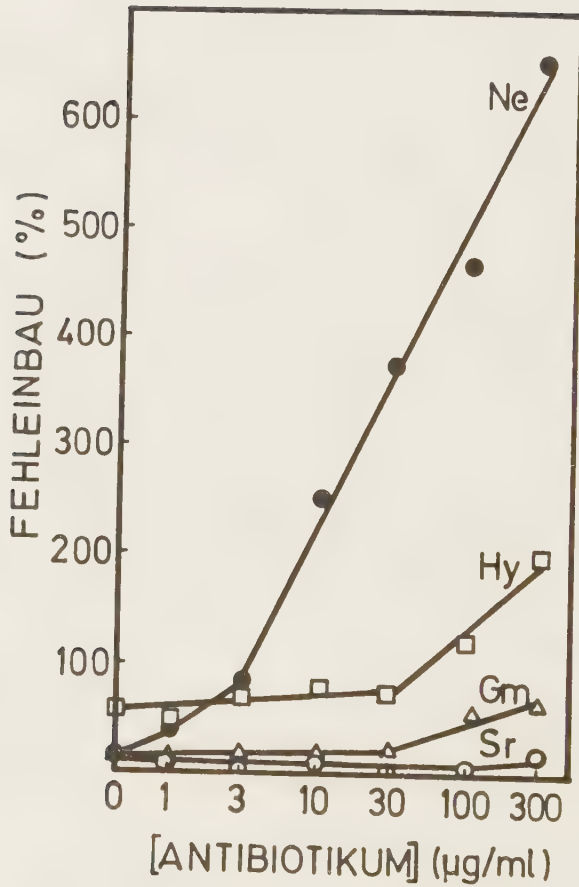


Abbildung 23:

Stimulation von Aminosäuren-Fehleinbau im poly(U)-abhängigen *in vitro* Translations-System von *Methanococcus vannielii* durch die Aminoglykoside Neomycin (Ne), Gentamicin (Gm), Streptomycin (Sr) und Hygromycin B (Hy)

D) DISKUSSION

Die L11-Domäne

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Proteinsyntheseapparates von Archaeobakterien. Zur Gruppe der Archaeobakterien werden Halobakterien, methanogene und thermoacidophile Organismen gerechnet. Es wird angenommen, daß sie einen ursprünglichen Organisationstyp von Zellen repräsentieren (32).

Zum besseren Verständnis der Phylogenie dieser Organismengruppe kann die Analyse der Struktur und Funktion des Proteinsyntheseapparates, insbesondere des Ribosoms, beitragen. Ribosomen gehören als essentielle Organelle zu den phylogenetisch streng konservierten Strukturen. Bisher war nicht klar, ob die Ribosomen von Archaeobakterien dem eubakteriellen 70S-Typ, dem eukaryontischen 80S-Typ oder einem eigenen Organisationstyp zuzuordnen sind.

Die bisherigen Untersuchungen hatten vor allem die Analyse der Proteinausstattung der Ribosomen von Archaeobakterien zum Ziel. Es war gefunden worden, daß sie heterogen ist und daß sie von der eines typischen 70S Eubakterien-Ribosoms bis zur Komplexität eines zwischen 70S und 80S intermediären Organells, wie bei Sulfolobus, reicht (35, 109, 110). Sulfolobus zum Beispiel besitzt Ribosomen mit einem um 500.000 höheren Partikelgewicht im Vergleich zu 70S Eubakterien-Organellen (34).

In dieser Arbeit sollten diese vornehmlich strukturellen Studien durch Untersuchungen von Funktionen des Ribosoms ergänzt

werden, vor allem solcher Funktionen, in denen sich 70S und 80S Ribosomen unterscheiden. Unsere Wahl fiel auf eine Domäne der 50S ribosomalen Untereinheit, die von den Proteinen L7/12, L10 und L11 gebildet wird. Die relative Lokation dieser Proteine auf der 50S Untereinheit konnte mit Hilfe der Immunelektronen-Mikroskopie von Stöffler (111) und Lake (112) festgelegt werden. Sie ist in Abbildung 23 wiedergegeben.

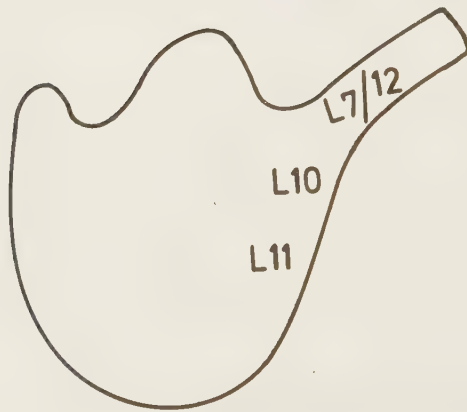


Abbildung 23:

Modell der 50S-Untereinheit des *E. coli*-Ribosoms nach Lake (112) und Stöffler (111). Eingezeichnet ist die Lage der r-Proteine L7/12 und L11 mit L10.

Diese Domäne des Ribosoms ist an folgenden Funktionen direkt beteiligt:

1. Wechselwirkung des Ribosoms mit Proteinsynthesefaktoren IF-2, EF-Tu, EF-G und den Release-Faktoren;
2. Bindung des Antibiotikums Thiostrepton, das, wenn gebunden, alle unter 1.) genannten Wechselwirkungen hemmt;
3. Bindung des "Stringent Faktors" und Aktivierung dieses Proteins zur Synthese von ppGpp.

L10 und L11 vermitteln weiterhin die Bindung der vier Kopien von L7/12, einem Protein, das, wie von Matheson und Mitarbeitern gefunden (113), bei Archaeobakterien typisch eukaryontische Sequenzcharakteristika aufweist.

Diese Funktion der L10/L11/L7/12 Domäne ist in Abbildung 24 schematisch wiedergegeben. Es muß hinzugefügt werden, daß L11 für die Bindung von Thiostrepton an das Ribosom nötig ist (114). Mutanten, die über Mutation resistent geworden sind, fehlt Protein L11 (115). Weiterhin sind Veränderungen im L11 Protein die Ursache für den relC-Phänotyp: relC-Mutanten haben Regulationsdefekte; an ihren Ribosomen kann das "Alarmon" ppGpp nicht gebildet werden, obwohl ein intakter Stringent Faktor vorhanden ist (116).

In vitro Proteinsynthese-System

In der vorliegenden Arbeit war nun als erstes herauszufinden, ob die Funktionen der eubakteriellen L11-Domäne an Archaeobakterien-Ribosomen vorhanden sind. Die Tatsache, daß Thiostrepton das Wachstum der Archaeobakterien hemmt, genügt dabei nicht als Nachweis für die Existenz eines ribosomalen Wirkorts, da bei diesen Organismen eine Funktion außerhalb des Proteinsynthese-

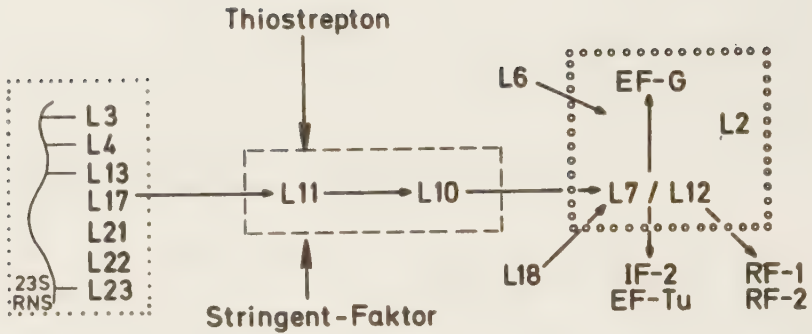


Abbildung 24:

Schema der L11/L10/L7/12-Domäne der 50S-Untereinheit des *E. coli*-Ribosoms nach Highland and Howard (139).

Waagrechte Pfeile zeigen enge Nachbarschaftsbeziehungen zwischen r-Proteinen an, die anderen Pfeile deuten Stellen an, an denen das Ribosom Wechselwirkungen mit Faktoren oder Antibiotika eingeht.

.....: Diese r-Proteine sind nach 4 M LiCl-Behandlung in einem Komplex zu finden.

---: L11 und L10 können chemisch quervernetzt werden (140).

ooo: L7/12 kann zusammen mit L2 an EF-G quervernetzt werden (131).

apparates durch das Antibiotikum inaktiviert werden könnte. Um die Spezifität der Thiostrepton-Wirkung auf die Proteinsynthese von Archaeobakterien zu prüfen, war es nötig, ein in vitro Polypeptidsynthese-System mit Ribosomen von Archaeobakterien aufzustellen.

Mit Zellextrakten aus Methanobacterium thermoautotrophicum konnte, selbst bei Variation aller Testbedingungen, keine Polypeptidsynthese erreicht werden. Für die weitere Arbeit wurden

deswegen als nächstes die mesophilen Archaeobakterien Methanococcus vanniellii und Methanobacterium formicicum gewählt. Dies hat den Vorteil, daß, anders als bei thermophilen und halophilen Organismen, die in vitro Proteinsynthese nicht unter hohen Temperaturen oder extremen Salzkonzentrationen durchgeführt zu werden brauchte. Dadurch bewirkte, mögliche sekundäre Effekte auf die Antibiotika-Wirkung waren deshalb nicht zu erwarten.

Einige Charakteristika des Methanococcus-Systems sind:

- (i) In vitro Aktivität konnte erst erreicht werden, wenn Ribosomen über Saccharose-Dichtegradienten gereinigt worden waren.
- (ii) Eine weitere Voraussetzung für die Aktivität dieses Systems war die Gegenwart von homologer Transfer-RNA, da tRNA aus E. coli durch die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase des Methanococcus-Zellextraktes nicht beladen wurde.
- (iii) Variation der Ionenbedingungen für dieses System ergab, daß die ungewöhnlich hohe Ammoniumionenkonzentration von 100 mM für optimale Aktivität erforderlich war.
- (iv) Die Testansätze wurden unter Schutzgas inkubiert, um etwaige Sekundäreffekte von Sauerstoff auf die Antibiotikawirkung zu vermeiden. Doch waren Kontrollansätze auch in Gegenwart von Sauerstoff aktiv; der Proteinsyntheseapparat dieses anaeroben Bakteriums ist also O₂-stabil.

Antibiotika-Sensitivität

Mit Hilfe dieses in vitro Elongationssystems konnte nun die Empfindlichkeit archaeobakterieller Ribosomen gegen Thiostrepton untersucht werden. Es ergab sich, daß Ribosomen von Mc. vanniellii und Mb. formicicum schon durch geringe Konzentrationen von Thio-

strepton inaktiviert wurden. Dieses Ergebnis zeigt, daß, was Thiostrepton-Bindung anbelangt, die L11-Domäne des Archaeobakterien-Ribosoms identische Eigenschaften wie die der 50S-Untereinheit des Ribosoms von Eubakterien aufweist.

Das entwickelte in vitro Proteinsynthese-System wurde nun weiter dazu benutzt, die Wirkung anderer Proteinsynthesehemmer auf Archaeobakterien-Ribosomen zu untersuchen. Tabelle 6 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse und ihre Gegenüberstellung mit in vivo Resultaten.

Von den untersuchten Hemmstoffen der Translation an 80S Ribosomen hatten Cycloheximid und Ricin keine Hemmwirkung auf die Aktivität von Ribosomen methanogener Bakterien. Dagegen zeigt die Inhibition durch Anisomycin, daß an Archaeobakterien-Ribosomen mit dem Anisomycin-Wirkort eine ausgesprochen eukaryontische Domäne vorhanden ist.

Von den Inhibitoren der 70S-Proteinsynthese konnte Chloramphenicol die in vitro Translation von Methanococcus nicht hemmen. Damit beruht die beschriebene Hemmung des Wachstums methanogener Bakterien durch Chloramphenicol nicht auf einer Inhibierung der Proteinsynthese, sondern möglicherweise auf der beobachteten Inaktivierung der Hydrogenase dieser Organismen (117, 118). Fehlende Wirkung von Chloramphenicol steht in Einklang mit Untersuchungen von Schmid et al. (119), die gezeigt hatten, daß weder Halobakterien- noch Methanococcus-Ribosomen eine Bindungsstelle für Chloramphenicol und Streptomycin besitzen.

Besonders interessant war es nun, die Wirkung von Aminoglykosid-Antibiotika auf Archaeobakterien-Ribosomen zu prüfen: neben der Translationshemmung verursachen Aminoglykoside ja Fehleinbau von Aminosäuren in Protein. Diese Substanzklasse enthält Verbindungen, die spezifische Hemmer der 70S Ribosomen von Eubakterien sind (Streptomycin) oder die gleichermaßen Proteinsynthese an 70S und 80S Ribosomen hemmen können (Neomycin u.a.). Es wurde fest-

Tabelle 6 : Hemmung des Wachstums und der Polypeptid-Synthese
methanogener Bakterien durch Antibiotika

Antibiotikum	Mc. vannielii		Mb. formicicum	
	Wachstum	in vitro- System	Wachstum	in vitro- System
Cycloheximid	-	-	-	-
Anisomycin	<u>+</u>	<u>+</u>	+	+
Verrucarín	-	-	n.u.	<u>+</u>
Ricin	n.u.	-	n.u.	-
Chloramphenicol	+	-	+	n.u.
Tetracyclin	<u>+</u>	-	-	n.u.
Erythromycin	-	-?	-	n.u.
Virginiamycin	^a	+	^a	n.u.
Thiostrepton	^b	+	n.u.	+
Tiamulin	<u>+</u>	-	n.u.	n.u.
Streptomycin	-	-	n.u.	n.u.
Gentamicin	-	+	+	n.u.
Neomycin	+	+	+	n.u.
Hygromycin B	-	<u>+</u>	n.u.	n.u.

a) Ergebnisse von Hilpert et al. (39)

b) Ergebnis von G. Schmid (unveröffentlicht); alle übrigen
in vivo Resultate stammen von Pecher und Böck (40).

n.u.: nicht untersucht

(?) : Das Ergebnis muß in einem initiierenden System bestätigt
werden.

Auswertung der in vivo Ergebnisse:

+, +, -: Minimale Hemmkonzentration 16 µg/ml oder geringer;
zwischen 30 und 500 µl/ml; mehr als 500 µg/ml.

Auswertung der in vitro Ergebnisse:

+, +, -: Hemmung der Polypeptid-Synthese bei Konzentrationen von
10 µg/ml oder weniger, zwischen 30 und 300 µg/ml, oder keine
Hemmung.

gestellt, daß die Ribosomen methanogener Bakterien resistent gegen Streptomycin, aber empfindlich gegen Neomycin, Gentamicin und Hygromycin B sind. Jedes der drei letztgenannten Antibiotika hat im Gegensatz zu Streptomycin einen 2-Deoxystreptaminrest im Molekül. Aus Studien ihrer Wirkung auf E. coli-Ribosomen war bekannt, daß es für diese Aminoglykoside mehr als nur einen möglichen Bindeort am Ribosom gibt (120, 121, 122).

Gentamicin dient im übrigen als Beispiel für die Hemmstoffe, die die Ribosomen von Methanococcus inaktivierten, das Wachstum dieses Organismus aber nicht hemmten. Möglicherweise können diese Wirkstoffe durch die Zellwand der methanogenen Bakterien nicht penetrieren.

Die bis hierher diskutierten Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

Die Ribosomen von Archaeobakterien bieten einer Reihe klassischer Proteinsynthese-Hemmstoffe wie Streptomycin oder Cycloheximid keinen Wirkort. Mit den Wirkstellen für Anisomycin und Thiostrepton sind an Archaeobakterien-Ribosomen funktionelle Domänen, sowohl von 80S-Eukaryonten-Ribosomen als auch von eubakteriellen 70S-Ribosomen, vorhanden.

ppGpp-Synthese

Wie schon erwähnt, ist zusätzlich zur Thiostrepton-Bindung eine zweite Funktion der L11-Domäne ihre Fähigkeit, den Stringent Faktor zur ppGpp-Synthese zu aktivieren.

Anhäufung von ppGpp löst den spezifisch eubakteriellen Regulationsmechanismus der Stringent Kontrolle aus. Da an 80S-Ribosomen der Eukaryonten keine ppGpp-Bildung ablaufen kann (25, 123), war es interessant zu untersuchen, ob dieser sekundäre Messenger in Archaeobakterien vorkommt.

An Kulturen von Halobakterien wurden physiologische Eingriffe

vorgenommen, die bei Eubakterien die Synthese von ppGpp bewirken (83-85). Es konnte keine ppGpp-Bildung nachgewiesen werden. Die nächste Frage war, ob Ribosomen von Archaeobakterien überhaupt fähig sind, ppGpp zu synthetisieren. Um dies zu klären, wurde von einem in vitro Reaktionsansatz Gebrauch gemacht, wie er von Haseltine et al. (57) das erste Mal beschrieben worden war.

Es stellte sich heraus, daß auch in vitro an 70S-Ribosomen methanogener Bakterien kein ppGpp gebildet wurde. Kontrollversuche schlossen die Möglichkeit aus, daß etwa gebildetes ppGpp gleich nach Synthese durch Phosphatase-Aktivität am Ribosom abgebaut wird.

Als nächstes wurde nun untersucht, ob Methanococcus-Ribosomen die strukturellen Voraussetzungen besitzen, Stringent Faktor zu aktivieren. Fehlende ppGpp-Synthese könnte ja auf der Abwesenheit eines solchen Faktors in Methanococcus vanniellii beruhen.

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden Archaeobakterien-Ribosomen zusammen mit "Stringent Faktor" von Eubakterien, der durch Hochsalzbehandlung von E. coli-Ribosomen abgetrennt worden war, inkubiert. Sowohl an Mc. vanniellii-Ribosomen als auch an solchen von Mb. formicicum bildete Stringent Faktor aus E. coli ppGpp. Da dieser Faktor zur ppGpp-Bildung eine bestimmte Ribosomenstruktur, nämlich die L11-Domäne, braucht, sind also an Archaeobakterien-Ribosomen die strukturellen Voraussetzungen zur ppGpp-Synthese vorhanden. Die dazu notwendige katalytische Aktivität aber fehlt.

In Eubakterien wirkt ppGpp als Effektor auf der Ebene der Transkription, indem es (wahrscheinlich) die Selektivität der RNA-Polymerase verändert (124). RNA-Polymerasen von Archaeobakterien unterscheiden sich strukturell von denen der Eubakterien; sie gleichen darin den RNA-Polymerasen der Eukaryonten, für die ppGpp kein Effektor darstellt (125, 126). Fehlende Synthese von ppGpp und Eukaryontencharakteristika des Zielorts von ppGpp, der

RNA-Polymerase, gehen in Eukaryonten und Archaeobakterien also kongruent.

Die eingangs gestellte Frage, ob Ribosomen von Archaeobakterien dem 70S-Typ der Eubakterien oder dem 80S-Typ der Eukaryonten-Ribosomen entsprechen, kann - nach den bisher vorliegenden Ergebnissen - wie folgt beantwortet werden:

Archaeobakterien-Ribosomen stellen weder den 70S- noch den 80S-Typ in reiner Form dar; vielmehr besitzen sie funktionelle Domänen, die teils typisch für Eubakterien-Ribosomen, teils für eukaryontische 80S-Ribosomen sind. Es ist damit nicht auszuschließen, daß die Ribosomen von Archaeobakterien eine Entwicklungslinie einer Ribosomen-Urform repräsentieren, von der aus sich die Linien der heutigen 70S- und 80S-Ribosomen herausentwickelten.

ppGpp-Wirkung in Eubakterien

Während ppGpp in Archaeobakterien nicht vorzukommen scheint, hat es in Eubakterien die wichtige Funktion eines Signalmoleküls, das verschiedene Regulationsmechanismen miteinander verbindet. Die Stringent Kontrolle ist solch einer der bakteriellen Regulationsmechanismen, der der Bakterienzelle eine rasche Anpassung an sich plötzlich verändernde Umweltbedingungen ermöglicht. Dabei wird vor allem die Menge der Komponenten des Translationsapparates pro Bakterienzelle variiert (9).

Bisher war nun nicht bekannt, ob die Stringent Kontrolle auch die Bildung der Proteinsynthese-Initiationsfaktoren reguliert. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deswegen untersucht, ob ppGpp die in vitro Synthese eines dieser Initiationsfaktoren, IF-3, beeinflussen kann, wie das für die Bildung der ribosomalen Proteine gezeigt worden war (18). Es wurde gefunden, daß IF-3-Synthese durch ppGpp inhibiert wird, obwohl in vivo unter Aminosäuremangel keine Hemmung der Synthese beobachtet wurde.

Eine plausible Erklärung dieser Diskrepanz wäre, daß an der Bildung der Initiationsfaktoren der Proteinsynthese mehrere Effektoren regulierend eingreifen. In vivo wird die Summe der Kontrolleffekte gemessen, in vitro der Effekt von ppGpp isoliert.

Diese Experimente zeigten weiter, daß die Bildung von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase und Threonyl-tRNA-Synthetase unter Aminosäuremangel nicht stringent reguliert ist. Dies steht in Einklang mit dem Befund, daß ihre in vitro-Synthese in Gegenwart von ppGpp stimuliert wird. Da bereits für das Isoleucin-spezifische Enzym Stimulierung der in vitro-Synthese durch ppGpp gefunden worden war (19), scheint die Stimulierung der Synthese der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen durch ppGpp ein genereller Kontrollmechanismus zu sein.

Kennzeichen der "Metabolischen Regulation" ist die reziproke Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und der ppGpp-Konzentration in der Zelle. Parallel mit der Wachstumsrate wird der zelluläre Anteil der entsprechend regulierten Komponenten des Proteinsyntheseapparates gebildet. Die geschilderten Ergebnisse lassen keinen Zweifel zu, daß IF-3 wachstumsratenabhängig synthetisiert wird. Die IF-3-Synthese ist in dieser Hinsicht mit der Ribosomenbildung korreliert. Resultate einer anderen Arbeitsgruppe (127) stimmen mit den unseren überein.

Während metabolische Regulation und Stringent Kontrolle auf der Ebene der Transkription ansetzen, war unlängst Evidenz für eine posttranskriptionelle Kontrolle, die sogenannte Autoregulation, in E. coli nachgewiesen worden. Es war gezeigt worden, daß ribosomale Proteine ihre eigene Synthese auf der Ebene der Translation zu hemmen vermögen (21, 22, 128). Diese Autoregulation ist eine Art Feinkontrolle; sie verhindert die Akkumulation von freien, nicht assemblierten ribosomalen Proteinen, wenn unter ungünstigen Wachstumsbedingungen die Ribosomensynthese stagniert. IF-3 hat die Fähigkeit, Ribosomen zu dissoziieren (64, 65). Es wäre deshalb denkbar, daß eine Überzahl an IF-3-Molekülen in der Zelle die

Proteinsynthesekapazität beeinträchtigt. Kann es zu einer solchen Überzahl kommen oder sorgt eine autogene Regulation für einen niedrigen IF-3-Spiegel?

Um diese Frage zu beantworten, wurde nun geprüft, ob IF-3 Gendosis-abhängig gebildet wird. Dazu wurde die Synthese von IF-3 in Stämmen untersucht, die mehr als eine Kopie des Strukturgens für IF-3 besitzen. Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend, daß IF-3 in diesen Stämmen in größeren Mengen als im haploiden Elternstamm gebildet wird. IF-3 ist demnach nicht dazu fähig, seine eigene Synthese zu reprimieren. Dieser Befund konnte im in vitro Translationssystem direkt bestätigt werden: Zugabe von IF-3-Protein bewirkte hier keine Repression der Bildung von IF-3.

In Tabelle 7 sind nun alle Mechanismen dargestellt, die in der Eubakterienzelle in die Synthese des Translationsapparates regulierend eingreifen.

IF-3 und die Ribosomen werden, wie alle bisher untersuchten Translations-Faktoren, metabolisch reguliert. Eine Feinkontrolle der IF-3-Bildung auf der Ebene der Translation findet offensichtlich nicht statt. Bereits in einer früheren Untersuchung aus unserem Labor war für Phenylalanyl-tRNA-Synthetase eine Gendosis-abhängige Synthese demonstriert worden (129), wie sie jetzt auch für IF-3 gezeigt wurde.

In Veröffentlichungen von Ochoa und von anderen Arbeitsgruppen (75, 130) war berichtet worden, daß IF-3 in zwei Formen in E. coli vorkommt. Analysen der IF-3-Proteinsequenz sowie der DNA-Primärstruktur seines Strukturgens hatten gezeigt, daß die kurze Form mit der langen bis auf sechs N-terminale Aminosäurereste identisch ist (133, 134).

Aus dem Verlauf der Kinetik der in vitro Synthese von IF-3 ist eindeutig abzulesen, daß die kurze Form als Produkt einer proteolytischen Umwandlung aus der langen hervorgeht. Ein weiteres

Tabelle 7: Einfluß von Regulationsmechanismen auf die Synthese von Komponenten des Proteinsyntheseapparates von E. coli

	Metabolische Regulation	Stringent Kontrolle	Auto- regulation	Quelle
	in vivo / in vitro			
Aminoacyl-tRNA- Synthetasen	+	-	stim.	- diese Arbeit (19)
Initiations- faktor 3	+	-	-	- diese Arbeit (127)
EF-Tu	+	+	inhib.	- (135, 136, 138)
EF-G	++	+	inhib.	+(135, 136, 138)
rRNA	++	+	+	-(22, 69)
r-Proteine	- ^{a)}	+	inhib.	+(22, 69, 137)

^{a)} Nach den Ergebnissen von Miura et al. (132) steht die Bildung der r-Proteine nicht direkt unter wachstumsraten-abhängiger Regulation; sie wird über den Autoregulationsmechanismus den Bedürfnissen der Ribosomensynthese angepaßt.

neues Resultat der vorliegenden Arbeit ist schließlich, daß beide Formen von IF-3 Produkte eines einzigen Gens sind.

E) ZUSAMMENFASSUNG

Um den Proteinsyntheseapparat von Archaeobakterien charakterisieren zu können, wurde für zwei methanogene Organismen ein poly(U)-abhängiges in vitro-Polypeptidsynthese-System aufgestellt.

Damit wurde die Empfindlichkeit von Archaeobakterien-Ribosomen gegen Proteinsynthese-Inhibitoren mit unterschiedlichen Hemmspektren festgestellt.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Hemmstoffe der Proteinsynthese an 70S-Ribosomen:

Thiostrepton und Virginiamycin hemmten die Aktivität der Ribosomen methanogener Bakterien; Chloramphenicol, Streptomycin, Tiamulin zeigten keine hemmende Wirkung.

Hemmstoffe der Proteinsynthese an 80S-Ribosomen:

Die in vitro-Translation methanogener Bakterien wurde durch Anisomycin inhibiert, nicht dagegen durch Cycloheximid und Ricin.

Hemmstoffe mit Wirkung auf die Proteinsynthese, sowohl an 70S als auch 80S-Ribosomen:

Neomycin, Gentamicin und Hygromycin B inhibierten die Translation an Ribosomen methanogener Bakterien; Tetracyclin hatte keine hemmende Wirkung auf dieses System.

Der Frage, ob das für Eubakterien typische Alarmon ppGpp in Archaeobakterien vorkommt, galten die im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Versuche. Die folgenden Ergebnisse wurden teils in Wachstumsversuchen, teils mit einem Proteinsynthese-

System in vitro gewonnen.

1. Weder unter Energiemangel- noch unter Aminosäurenmangelbedingungen bildeten Halobakterienkulturen ppGpp.
2. An Archaeobakterien-Ribosomen wurde in vitro keine ppGpp-Synthese beobachtet.
3. Ribosomen von Archaeobakterien können in vitro den Stringent-Faktor aus E. coli zur ppGpp-Bildung aktivieren.

Der weitere Teil der vorliegenden Arbeit sollte zur Beantwortung der Frage beitragen, ob ppGpp auf die Synthese sämtlicher Komponenten des Proteinsyntheseapparates Einfluß nimmt. Dazu wurde der Effekt von ppGpp auf die in vivo- und in vitro-Bildung des Initiationsfaktors 3 sowie zweier Aminosäuren-aktivierender Enzyme, Phenylalanyl-tRNA-Synthetase und Threonyl-tRNA-Synthetase, untersucht.

Die Ergebnisse lassen folgendes erkennen:

1. Die Synthese von IF-3 wird wachstumsraten-abhängig reguliert; einer autogenen Regulation unterliegt sie nicht. Unter "Stringent"-Bedingungen wurde die IF-3-Bildung nicht gehemmt. ppGpp übte auf die in vitro-Synthese von IF-3 einen inhibierenden Effekt aus.
 2. Die Bildung von Threonyl-tRNA-Synthetase und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase wird in Abhängigkeit von der Wachstumsrate gebildet. ppGpp hemmt die Synthese beider Enzyme in vivo nicht, sondern stimuliert vielmehr deren Bildung in vitro.
-

F) LITERATURVERZEICHNIS

1. Maaløe, O. (1969) Develop. Biol. 3, 33-58
2. Jaskunas, S.R., Lindahl, L., Nomura, M., Burgess, R.R. (1975) Nature 257, 458-462
3. Jaskunas, S.R., Burgess, R.R., Nomura, M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 5036-5040
4. Lindahl, L., Zengel, J., Nomura, M. (1976) J. Mol. Biol. 106, 837-855
5. Lund, E., Dahlberg, J.E., Lindahl, L., Jaskunas, S.R., Dennis, P.P., Nomura, M. (1976) Cell 7, 165-177
6. Gausing, K. (1977) J. Mol. Biol. 115, 335-354
7. Maaløe, O., Kjeldgaard, N.O. (1966) in: Control of Macromolecular Synthesis. W.A. Benjamin, Inc., New York
8. Parker, J., Neidhardt, F.C. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 495-501
9. Gallant, J. (1979) Annu. Rev. Genet. 13, 393-415
10. O'Farrell, P.H. (1978) Cell 14, 545-557
11. Lazzarini, R.A., Cashel, M., Gallant, J. (1971) J. Biol.Chem. 246, 4381-4385

12. Cashel, M., Gallant, J. (1969) *Nature* 221, 838-841
13. Block, R., Haseltine, W.A. (1974) in: *Ribosomes* (Hrsg. Nomura, M., Tissières, A., Lengyel, P.). Cold Spring Harbor, New York, 747-761
14. Morse, D.E., Morse, A.N.C. (1976) *J. Mol. Biol.* 103, 209-226
15. Reiness, G., Yang, H.L., Zubay, G., Cashel, M. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2881-2885
16. Block, R. (1976) in: *Control of Ribosome Synthesis*; Alfred Benzon Symp. IX (Hrsg. Kjeldgaard, N.O., Maaløe, O.), 226-238
17. Van Ooyen, A.J., de Boer, H.A., Ab, G., Gruber, M. (1975) *Nature* 254, 530-531
18. Lindahl, L., Post, L., Nomura, M. (1976) *Cell* 9, 439-448
19. Wirth, R., Buckel, P., Böck, A. (1977) *FEBS Lett.* 83, 103-106
20. Stephens, J.C., Artz, S.W., Ames, B.N. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4389-4393
21. Wirth, R., Böck, A. (1980) *Molec. Gen. Genet.* 178, 479-481
22. Dean, D., Yates, J.L., Nomura, M. (1981) *Cell* 24, 413-419
23. Hennecke, H., Springer, M., Böck, A. (1977) *Molec. Gen. Genet.* 152, 205-210
24. Plumbridge, J.A., Springer, M., Graffe, M., Goursot, R., Grunberg-Manago, M. (1980) *Gene* 11, 33-42

25. Silverman, R.H., Atherly, A.G. (1979) Microbiol. Reviews 43, 27-41
26. Kandler, O., König, H. (1978) Arch. Microbiol. 118, 141-152
27. Makula, R.A., Singer, M.E. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 716-722
28. Tornabene, T.G., Langworthy, T.A. (1978) Science 203, 51-53
29. Zillig, W., Stetter, K.O., Schnabel, R., Madon, J., Gierl, A. (1982) Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C 3, 218-227
30. Zillig, W., Stetter, K.O., Tobien, M. (1978) Eur. J. Biochem. 91, 193-199
31. Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4537-4541
32. Woese, C.R., Magrum, D.J., Fox, G.E. (1978) J. Molec. Evol. 11, 245-252
33. Jarsch, M., Altenbuchner, J., Böck, A. (1983) Molec. Gen. Genet. 189, 41-47
34. Schmid, G., Böck, A. (1982) Molec. Gen. Genet. 185, 498-501
35. Londei, P., Teichner, A., Cammarano, P., de Rosa, M., Gambacorta, A., zur Veröffentlichung eingereicht
36. Kessel, M., Klink, F. (1980) Nature 287, 250-251
37. Collier, R.J. (1967) J. Mol. Biol. 25, 83-98
38. Goor, R.S., Pappenheimer, A.M. jr. (1967) J. Exp. Med. 126, 913-921

39. Hilpert, R., Winter, J., Hammes, W., Kandler, O. (1981)
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C 2, 11-20
40. Pecher, T., Böck, A. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 10, 295-297
41. Weisburg, W.G., Tanner, R.S. (1982) FEMS Microbiol. Lett. 14, 307-310
42. Schrenk, W.J., Weisberg, R.A. (1975) Molec. Gen. Genet. 137, 101-107
43. Blumenthal, R.M., Lemaux, P.G., Neidhardt, F.C., Dennis, P. P. (1976) Molec. Gen. Genet. 149, 291-296
44. Fiil, N., Friesen, J.D. (1968) J. Bacteriol. 95, 729-731
45. Stöcklein, W., Piepersberg, W. (1980) Curr. Genetics 1, 177-183
46. Zubay, G., Chambers, D.A., Cheong, L.C. (1970) in: The Lactose Operon (Hrsg. Beckwith, J.R., Zipser, D.) Cold Spring Harbor Lab., New York, 375-391
47. Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., Smith, D.F. (1974) J. Bacteriol. 109, 736-747
48. Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., Pedersen, S., Reeh, S. (1977) J. Bacteriol. 129, 378-387
49. DSM-Katalog (1977). Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
50. Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S. (1963) J. Biol. Chem. 238, 2882-2886

51. O'Farrell, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
52. O'Farrell, P.Z., Godman, H.M., O'Farrell, P.H. (1977) Cell 12, 1133-1142
53. Cashel, M., Lazzarini, R.A., Kalbacher, B. (1969) J. Chromatogr. 40, 103-109
54. Cashel, M., Kalbacher, B. (1970) J. Biol. Chem. 245, 2309-2318
55. Zubay, G. (1973) Ann. Rev. Genet. 7, 267-287
56. Ehrenstein von, G. (1967) in: Methods in Enzymology Vol. XII (Hrsg. Grossmann, L., Moldave, K.), 588-596
57. Haseltine, W.A., Block, R., Gilbert, W., Weber, K. (1972) Nature 238, 381-384
58. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.A., Randall, R.I. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
59. Ehresmann, B., Imbault, P., Weil, J.H. (1973) Analyt. Biochem. 54, 454
60. Pedersen, S., Block, P.L., Reeh, S., Neidhardt, F.C. (1978) Cell 14, 179-190
61. Geyl, D., Böck, A. (1977) Molec. Gen. Genet. 154, 327-334
62. Olsson, M.O., Isaakson, L.A. (1979) Molec. Gen. Genet. 169, 271-278
63. Hennecke, H., Böck, A., Thomale, J., Nass, G. (1977) J. Bacteriol. 131, 943-950

64. Davis, B.D. (1974) in: Ribosomes (Hrsg. Nomura, M., Tissieres, A., Lengyel., P.) Cold Spring Harbor Lab., New York, 705-710
65. Kaempfer, R. (1972) J. Mol. Biol. 71, 583-598
66. Springer, M., Graffe, M., Hennecke, H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3970-3974
67. Lestienne, P., Dondon, J., Plumbridge, J.A., Howe, G., Mayaux, J.F., Springer, M., Blanquet, S., Hershey, J.W.B., Grunberg-Manago, M. (1982) Eur. J. Biochem. 123, 483-488
68. Schleif, R. (1967) J. Mol. Biol. 27, 41-55
69. Dennis, P.P., Nomura, M. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1909-1913
70. Reeh, S., Pedersen, S., Friesen, J.D. (1976) Molec. Gen. Genet. 149, 279-289
71. Elhardt, D., Wirth, R., Böck, A. (1982) Eur. J. Biochem. 123, 477-482
72. Bachmann, B.J., Low, K.B. (1980) Microbiol. Reviews 44, 1-56
73. Bloch, P.L., Philips, T.A., Neidhardt, F.C. (1980) J. Bacteriol. 141, 1409-1420
74. Phillips, T.A., Bloch, P.L., Neidhardt, F.C. (1980) J. Bacteriol. 144, 1024-1033
75. Suryanarayana, T., Subramanian, A.R. (1977) FEBS Lett. 79, 264-268
76. Minks, M., Suryanarayana, T., Subramanian, A.R. (1978) Eur. J. Biochem. 82, 271-277

77. Stephens, J.C., Artz, S.W., Ames, B.N. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4389-4393
78. Cashel, M. (1975) Ann. Rev. Microbiol. 29, 301-318
79. Lindahl, L., Post, L., Nomura, M. (1976) Cell 9, 439-448
80. Lund, E., Kjeldgaard, N.O. (1972) Eur. J. Biochem. 28, 316-326
81. Lindahl, L., Zengel, J.M. (1982) Adv. Genet. 21, 53-121
82. Friesen, J.D., Fiil, N.P., Dennis, P.P., Downing, W.L., An, G., Holowachuk, E. (1979) in: Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.), 719-742
83. Hughes, J., Mellows, G. (1978) Biochem. J. 176, 305-318
84. Imai, K., Asano, A., Sato, R. (1967) Biochim. Biophys. Acta 143, 462-476
85. Fehr, S., Richter, D. (1981) Arch. Microbiol. 129, 29-31
86. Sy, J., Lipmann, F. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 306-309
87. Haseltine, W.A., Block, R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1564-1568
88. Elhardt, D., Böck, A. (1982) Molec. Gen. Genet. 188, 128-134
89. Block, R., Haseltine, W.A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1212-1217
90. Lipmann, F., Sy, J. (1976) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 17, 1-14

91. Cochran, J.W., Byrne, R.W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 353-360
92. Richter, D. (1973) FEBS Lett. 34, 291-294
93. Vazquez, D. (1979) in: Inhibitors of Protein Synthesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1-14
94. Tai, P.-C., Davis, B.D. (1979) Biochemstriy 18, 193-198
95. Tanaka, N. (1982) in: Aminoglycoside Antibiotics (Hrsg. Umezawa, H., Hooper, I.R.) Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 221-229
96. Sprott, G.D., Jarrell, K.F. (1981) Can. J. Microbiol. 27, 444-451
97. Kaji, A., Ryoji, M. (1979) in: Antibiotics III (Hrsg. Hahn, F.E.), 304-328. Springer Verlag Berlin, Heidelberg New York
98. Laskin, A.I., Chan, W.M. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 137-142
99. Hodgkin, L.A., Högenauer, G. (1974) Eur. J. Biochem. 47, 527-533
100. Högenauer, G. (1979) in: Antibiotics III (Hrsg. Hahn, F.E.), 344-360. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
101. Pestka, S. (1977) in: Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis (Hrsg. Weissbach, H., Pestka, S.), Academic Press New York, 521-523
102. Weisblum, B., Demohn, V. (1970) J. Bacteriol. 101, 1073-1075

103. Kučan, Z., Lipmann, F. (1964) J. Biol. Chem. 239, 516-520
104. Vázquez, D., Jiménez, A. (1979) in: Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.), 748-769
105. Grollman, A.P. (1967) J. Biol. Chem. 243, 4089-4094
106. Cousin, M.A., Lando, D., Ojasoo, T., Raynand, J.P. (1977) Biochimie 59, 59-63
107. Gris  -Miron, L., Noreau, J., Melancon, P., Brakier-Gingras, L. (1981) Biochim. Biophys. Acta 656, 103-110
108. Piepersberg, W., Noseda, V., Böck, A. (1979) Molec. Gen. Genet. 171, 23-34
109. Douglas, C., Achatz, F., Böck, A. (1980) Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 1-11
110. Schmid, G., Böck, A. (1982) Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 347-353
111. Stöffler, G., Bald, R., Kastner, B., L  hrmann, R., Stöffler-Meilicke, M., Tischendorf, G. (1979) in: Ribosomes (Hrsg. Chambliss, G., Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M.) University Park Press, Baltimore, 171-206
112. Lake, J.A., Henderson, E., Clark, M.W., Matheson, A.T. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5948-5952
113. Matheson, A.T., Yaguchi, M., Balch, W.E., Wolfe, R.S. (1980) Biochim. Biophys. Acta 626, 162-169
114. Highland, J.H., Howard, G.A., Ochsner, E., Stöffler, G., Hasenbank, R., Gordon, J. (1975) J.Biol.Chem. 250, 1141-1145

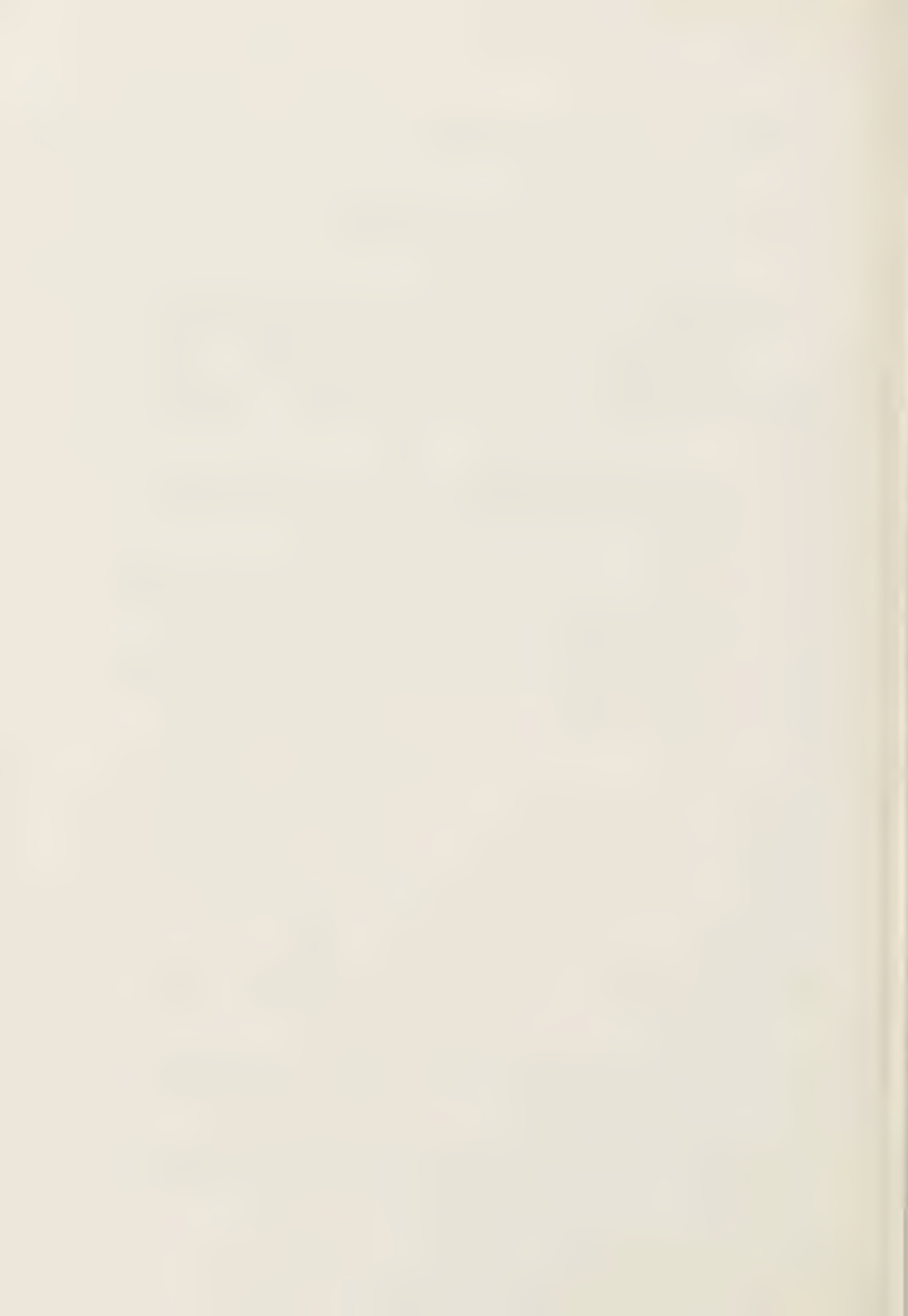
115. Cundliffe, E., Dixon, P., Stark, M., Stöffler, G., Ehrlich, R., Stöffler-Meilicke, M., Cannon, M. (1979) J. Mol. Biol. 254, 235-252
116. Parker, J., Watson, R.J., Friesen, J.D., Fiil, N. (1976) Mol. Gen. Genet. 144, 111-114
117. Gunsalus, R.P., Wolfe, R.S. (1978) J. Bacteriol. 135, 851-857
118. McKellar, R.C., Sprott, G.D. (1979) J. Bacteriol. 139, 231-238
119. Schmid, G., Pecher, T., Böck, A. (1982) Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 209-217
120. Tai, P.C., Davis, B.D. (1979) Biochemistry 18, 193-198
121. Zierhut, G., Piepersberg, W., Böck, A. (1979) Eur. J. Biochem. 98, 577-583
122. Kühberger, R., Piepersberg, W., Petzet, A., Buckel, P., Böck, A. (1979) Biochemistry 18, 187-193
123. Buckel, P., Böck, A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 324, 184-187
124. Travers, A. (1976) Mol. Gen. Genet. 147, 225-232
125. Prangshvilli, D., Zillig, W., Gierl, A., Biesert, L., Holz, I. (1982) Eur. J. Biochem. 122, 471-477
126. Burgess, R.R. (1976) in: RNA Polymerase (Hrsg. Losick, R., Chamberlin, M.) Cold Spring Harbor Lab., New York, 369-396
127. Howe, J.G., Hershey, J.W.B. (1983) J. Biol. Chem. 258, 1954-1959

128. Dean, D., Nomura, M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3590-3594
129. Gröll, J.M., Hennecke, H., Fröhler, J., Thomale, J., Nass, G., Böck, A. (1979) J. Bacteriol. 137, 480-489
130. Lee-Huang, S., Ochoa, S. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 156, 84-96
131. Acharya, A., Moore, P.B., Richards, F.M. (1973) Biochemistry 12, 3108-3114
132. Miura, A., Krueger, J.H., Hoh, S., de Boer, H., Nomura, M. (1981) Cell 25, 773-782
133. Brauer, D., Wittmann-Liebold, B. (1977) FEBS Lett. 79, 269-275
134. Sacerdot, C., Fayat, G., Dessen, P., Springer, M., Plumbridge, J., Grunberg-Manago, M., Blanquet, S. (1982) EMBO Journ. 1, 311-315
135. Furano, A. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4780-4784
136. Furano, A., Wittel, F.P. (1976) J. Biol. Chem. 251, 898-901
137. Dennis, P.P., Bremer, H. (1974) J. Mol. Biol. 84, 407-422
138. Nomura, M., Yates, J.L., Dean, D., Post, L.E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7084-7088
139. Highland, J.H., Howard, G.A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 831-834
140. Clegg, C., Hayes, D. (1974) Eur. J. Biochem. 42, 21-28

Herrn Prof, Dr, A. Böck möchte ich für das intensive Interesse an diesen Untersuchungen, die vielen hilfreichen Ratschläge und seine große Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

Allen meinen Kollegen möchte ich für zahlreiche Hinweise Dank sagen.

Frau Margit Geier danke ich herzlich für die Drucklegung dieser Arbeit.



Lebenslauf

Am 29. September 1952 wurde ich, Dieter Elhardt, als Sohn des Stadtrechtsrates Dr. Georg Elhardt und seiner Frau Hedwig Elhardt, geb. Pronnet, in Kempten/Allgäu geboren.

Dort besuchte ich von 1958 bis Sommer 1962 die Volksschule an der Sutt und von Herbst 1962 an das Humanistische Gymnasium. Von dieser Schule erhielt ich im Sommer 1971 das Reifezeugnis.

Nach Ableistung des Wehrdienstes begann ich zum Wintersemester 1972/73 an der Universität Hohenheim das Fach Biologie (Diplom) zu studieren. Im Wintersemester 1974/75 legte ich dort die Vordiplomprüfung ab.

Anschließend setzte ich das Studium im selben Fach an der Universität Regensburg fort. 1977 legte ich dort die theoretische Diplom-Hauptprüfung ab.

Die Diplomarbeit fertigte ich im Jahr 1978 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg an.

Dort begann ich zu Anfang 1979 unter der Anleitung von Prof.Dr. A. Böck mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertationsarbeit, die ich am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München fertigstellte.

Introduction

The purpose of this study is to investigate the relationship between the variables of interest. The study is designed to provide a comprehensive overview of the current state of research in this field. The research is organized into several sections, each focusing on a specific aspect of the problem. The first section discusses the theoretical background and the importance of the study. The second section describes the methodology used in the study, including the data collection and analysis techniques. The third section presents the results of the study, and the fourth section discusses the implications of the findings. The study is intended to provide a valuable contribution to the understanding of the phenomenon under investigation.

